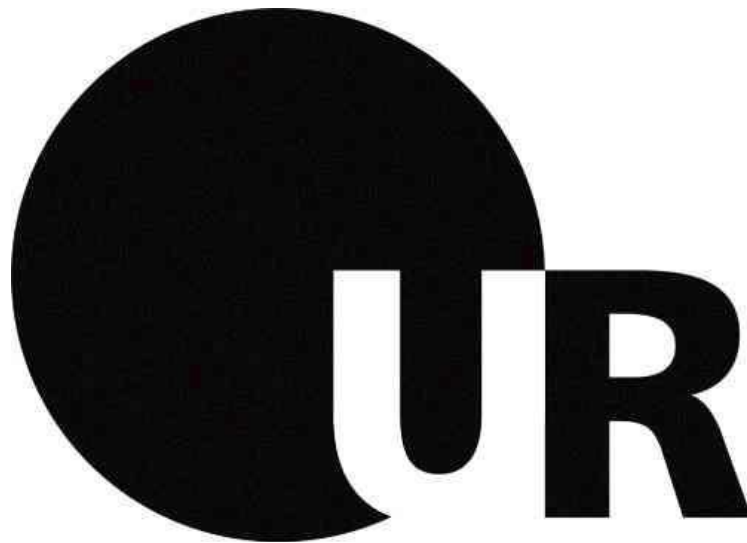


# **Funktionelle Analyse des ATP13A2 Orthologs in *D. melanogaster***



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG  
DES DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)  
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

VORGELEGT VON  
SABINA HEßNER  
AUS KARLSRUHE  
IM JAHR 2015

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am 24.08.2015

Die Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. Stephan Schneuwly

Sabina Heßner

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>7</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>8</b>
1.1 Idiopathisches Parkinson Syndrom .....	8
1.2 Familiäres Parkinson Syndrom.....	9
1.2.1 $\alpha$ -Synuclein .....	9
1.3 Kufor-Rakeb Syndrom .....	10
1.3.1 Proteinstruktur und Funktion von ATP13A2 .....	12
1.3.2 Proteinexpression und Lokalisation von ATP13A2.....	14
1.3.3 Pathophysiologie von KRS .....	14
1.4 Proteindegradation .....	16
1.4.1 Das Ubiquitin-Proteasom System .....	16
1.4.2 Autophagie.....	17
1.4.3 Proteindegradation und Parkinson .....	18
1.5 <i>Drosophila</i> als Modellorganismus für neurodegenerative Erkrankungen .....	20
1.6 Zielsetzung dieser Arbeit .....	21
<b>2 Material .....</b>	<b>22</b>
2.1 Organismen.....	22
2.1.1 Bakterienstämme und Zellkultur .....	22
2.1.2 Fliegenstämme .....	22
2.1.2.1 Verwendete Responderlinien .....	22
2.1.2.2 Verwendete Treiberlinien.....	23
2.1.2.3 Wildtypstamm, Mutanten und weitere Stämme .....	24
2.2 Medien .....	24
2.3 Vektoren .....	24
2.4 Oligonukleotide.....	25
2.5 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe.....	26
2.6 Kitsysteme.....	26
2.7 Puffer und Lösungen .....	27
2.8 Größenstandards und Enzyme .....	28
2.9 Software.....	28
2.10 Chemikalien und Verbrauchsmaterial .....	29
<b>3 Methoden.....</b>	<b>30</b>
3.1 Molekularbiologische Methoden.....	30

3.1.1 Plasmid-Minipräparation .....	30
3.1.2 DNA-Spaltung durch Restriktionsenzyme .....	30
3.1.4 Agarosegelelektrophorese/Gelextraktion .....	30
3.1.5 Ligation .....	30
3.1.6 Hitzeschocktransformation von <i>E. coli</i> .....	30
3.1.7 Polymerase-Kettenreaktion .....	31
3.1.8 RNA-Isolierung .....	31
3.1.9 Konzentrationsbestimmung .....	31
3.1.10 Reverse Transkription .....	31
3.1.11 Semi-quantitative <i>Real-time</i> -PCR .....	31
3.2 SDS-Page und Western Blot .....	32
3.2.1 Proteinextraktion .....	32
3.2.2 SDS-Page .....	32
3.2.3 <i>Semi-dry</i> Western Blot .....	32
3.3 Histologie .....	33
3.3.1 <i>Whole mount</i> Präparation von Fliegengehirnen .....	33
3.3.2 <i>Whole mount</i> Präparation der indirekten Flugmuskulatur .....	34
3.3.3 Lysotracker Färbung im larvalen Fettkörper .....	34
3.3.4 Lysotracker-Färbung von S2-Zellen .....	34
3.3.5 Quantifizierung der GFP-Signalintensität in dopaminergen Neuronen .....	34
3.4 Keimbahntransformation .....	34
3.4.1 Mikroinjektion .....	34
3.4.2 Selektion der transformierten Fliegen und Balancierung der Stämme .....	35
3.5 Biochemische Methoden .....	35
3.5.1 Cathepsin D-Messung .....	35
3.6 S2-Zellkultur .....	35
3.6.1 Kultivierung von S2-Zellen .....	35
3.6.2 Transfektion .....	35
3.7 Organismische Methoden .....	36
3.7.1 Alterung, Metall- und Polyaminversuche .....	36
3.8 Verhaltensversuche .....	36
3.8.1 Negative Geotaxis .....	36
3.9 Statistische Auswertung .....	36
4 Ergebnisse .....	37
4.1 Das <i>Drosophila</i> Ortholog zum humanen ATP13A2 .....	37
4.1.1 Isoformen und Struktur .....	37

4.2 Herstellung von p[UAS- <i>dPark9H-GFP</i> ] und p[UAS- <i>dPark9G-GFP</i> ] .....	39
4.3 Subzelluläre Lokalisation von <i>dPark9</i> .....	41
4.3.1 <i>DPark9H</i> - und <i>dPark9G-GFP</i> sind in den Lysosomen von S2-Zellen lokalisiert .....	41
4.3.2 Lokalisation von <i>dPark9H-GFP</i> in Lysosomen, Endosomen und der Membran im larvalen Fettkörper .....	42
4.4 Phänotypenanalyse .....	43
4.4.1 Charakterisierung der <i>dPark9-knockdown</i> - und <i>dPark9H</i> -Überexpressionslinien .....	43
4.4.2 Reduzierte Lebensdauer von <i>dPark9</i> -defizienten Fliegen .....	45
4.4.3 Veränderungen der <i>dPark9</i> -Expression führen zu einer Reduktion der negativen Geotaxis .....	46
4.4.4 Beeinflussung der Augenentwicklung durch <i>dPark9H</i> -Überexpression .....	47
4.4.5 <i>DPark9</i> -defiziente Fliegen zeigen im Gegensatz zu <i>dPark9H</i> -überexprimierenden Fliegen keine Degeneration der dopaminergen Neuronen ....	48
4.4.6 Reduktion der GFP-Signalintensität in dopaminergen Neuronen in jungen <i>dPark9H</i> -überexprimierenden und alten <i>dPark9</i> -defizienten Fliegen .....	53
4.4.7 Keine Degeneration von PDF-Neuronen durch die Überexpression von <i>dPark9H</i> .....	55
4.4.8 Analyse der indirekten Flugmuskulatur .....	57
4.4.8.1 <i>DPark9-RNAi 1</i> - Fliegen zeigen einen Muskelphänotyp der DLM .....	57
4.4.8.2 Entwicklungsphänotyp der DLM .....	58
4.4.8.3. Überexpression von <i>dPark9H</i> zeigt keinen Muskelphänotyp .....	59
4.4.8.4 Spezifität des <i>dPark9 RNAi 1</i> - Phänotyps .....	60
4.5 Funktionsanalyse .....	61
4.5.1 Beeinträchtigung der allgemeinen Fitness und Neuronenintegrität unter diätischen Bedingungen .....	61
4.5.2 Einfluss von Metallen auf die Lebensdauer .....	64
4.5.2.1 Exposition gegenüber Zinkchlorid führt zu einer Verlängerung der Lebensspanne von <i>dPark9</i> -defizienten und <i>dPark9H</i> -überexprimierenden Fliegen .....	64
4.5.2.2 Positiver Einfluss von Manganchlorid auf die Lebensdauer von <i>dPark9</i> -defizienten und <i>dPark9H</i> -überexprimierenden Fliegen .....	66
4.5.3 Kein Einfluss von Norspermidin auf die Lebensdauer von <i>dPark9</i> -defizienten und <i>dPark9H</i> -überexprimierenden Fliegen .....	68
4.5.4 Einfluss von Metallen und Polyaminen auf die Integrität der dopaminergen Neuronen .....	70
4.5.4.1 Kein Einfluss von ZnCl <sub>2</sub> auf die GFP-Signalintensität in dopaminergen Neuronen .....	70

4.5.4.2 MnCl <sub>2</sub> führt zu einer reduzierten GFP-Signalintensität in dopaminergen Neuronen .....	72
4.5.4.3 Veränderte <i>dPark9</i> -Expression schützt dopaminerge Neuronen gegenüber Norspermidin .....	74
4.6 Einfluss einer veränderten <i>dPark9</i> -Expression auf die Proteindegradation.....	77
4.6.1 Beeinträchtigung der lysosomalen Abbauwege durch <i>dPark9-knockdown</i> ..	77
4.6.2 Veränderte Cathepsin D-Aktivität in jungen <i>dPark9</i> -RNAi- und <i>dPark9H</i> -überexprimierenden Fliegen.....	79
5 Diskussion .....	81
5.1 Das <i>Drosophila</i> Ortholog zum humanen ATP13A2 (PARK9) .....	81
5.2 Essentielle Rolle von dPark9 .....	82
5.3.1 Rolle von dPark9 in der Muskelentwicklung .....	83
5.4 Einfluss von dPark9 auf das Entwicklungsmodell Auge.....	84
5.5 Analyse von dPark9 im dopaminergen System .....	85
5.6 Molekulare und zelluläre Funktion von dPark9.....	88
5.6.1 DPark9 ist in den Lysosomen lokalisiert .....	88
5.6.2 <i>Knockdown</i> von dPark9 führt zur Akkumulation von α-Synuclein .....	89
5.5.3 Auswirkungen einer veränderten <i>dPark9</i> -Expression auf die Cathepsin D-Aktivität.....	91
5.7 Analyse der potentiellen Substrate von dPark9 .....	92
5.7.1 Zink als mögliches Substrat von dPark9 .....	92
5.7.2 Mangan als mögliches Substrat von dPark9 .....	95
5.7.3 Norspermidin als mögliches Substrat von dPark9 .....	97
6 Literaturverzeichnis.....	99
7 Anhang .....	113
7.1 Verzeichnis der Abbildungen.....	113
7.2 Verzeichnis der Tabellen .....	115
7.3 Verzeichnis der Abkürzungen .....	115
7.4 Graphen und Tabellen .....	117
7.4.1 Sequenz <i>dPark9H-GFP</i> .....	118
7.4.2 Überexpressionslinie p[ <i>UAS-dPark9H-GFP</i> ] .....	120
7.4.3 Zeitliche und örtliche <i>dPark9</i> -Expression.....	120

## Zusammenfassung

Das Kufor-Rakeb Syndrom ist eine juvenile Form von Parkinson, die autosomal rezessiv vererbt wird. Über 20 verschiedene Mutationen wurden im betroffenen Gen *ATP13A2* (PARK9) bisher gefunden. Es codiert für eine  $P_{5B}$ -ATPase, bei der die Substratspezifität noch nicht geklärt ist.

Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich mit der Analyse des Orthologs von *ATP13A2* im Modellorganismus *Drosophila melanogaster*. Dazu wurden die Auswirkungen einer veränderten *dPark9*-Expression in verschiedenen Geweben und Systemen untersucht. Außerdem sollten die potentiellen Substrate der  $P_{5B}$ -ATPase auf ihre Richtigkeit und ihren Einfluss hin analysiert werden.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Veränderung der *dPark9*-Menge die Vitalität von *D. melanogaster* beeinträchtigt. Ein *dPark9-knockdown* wirkt sich in einer Verkürzung der Lebensdauer aus. Sowohl eine Reduktion als auch eine Erhöhung der Expression führt zu einer Verschlechterung der lokomotorischen Fähigkeiten und spricht für eine essentielle Funktion des Proteins im Nervensystem. Des Weiteren spielt das Gen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der indirekten Flugmuskulatur (IFM), da ein Mangel an *dPark9* zu anormal ausgebildeten Muskelsträngen führt.

Ein *knockdown* von *dPark9* spezifisch in dopaminergen Neuronen führt zu keinem Verlust der Neuronen. Es konnte jedoch eine altersabhängige Reduktion der GFP-Signalintensität detektiert werden, was auf eine Beeinträchtigung der Neuronenfunktion hindeutet. Die Überexpression der Isoform *dPark9H* zeigt hingegen einen entwicklungs- und altersabhängigen Verlust der dopaminergen Neuronen und des GFP-Signals.

Die Lokalisation des homologen Proteins konnte in den Lysosomen, späten Endosomen und der Zellmembran von Fettkörperzellen nachgewiesen werden. Der Verlust von *dPark9* führt zu einer Akkumulation von  $\alpha$ -Synuclein und verdeutlicht den Zusammenhang mit einem weiteren Parkinsonsogen sowie die Beteiligung des Proteins bei Degradationsprozessen.

Ein weiterer Teil der Arbeit befasste sich mit der Ermittlung eines möglichen Substrats des Transportproteins. Lebensdauerexperimente unter Substrateinfluss zeigten eine Tendenz für die Metalle Zink und Mangan. Die Auswirkungen dieser beiden Metalle sowie des Polyamins Norspermidin auf die dopaminergen Neuronen wiesen allerdings gegensätzliche Ergebnisse auf und verdeutlichen die Komplexität dieses Themas. Hier sind weitere Untersuchungen notwendig um eine klare Aussage über die Art der Substrationen treffen zu können.

# 1 Einleitung

## 1.1 Idiopathisches Parkinson Syndrom

Parkinson ist nach Alzheimer die häufigste neurodegenerative Erkrankung und wurde erstmals 1817 vom englischen Arzt James Parkinson beschrieben (Parkinson, 1817). Weltweit sind 1-2% der über 65-jährigen und 4% der über 85-jährigen von der Krankheit betroffen (Coppedè, 2012).

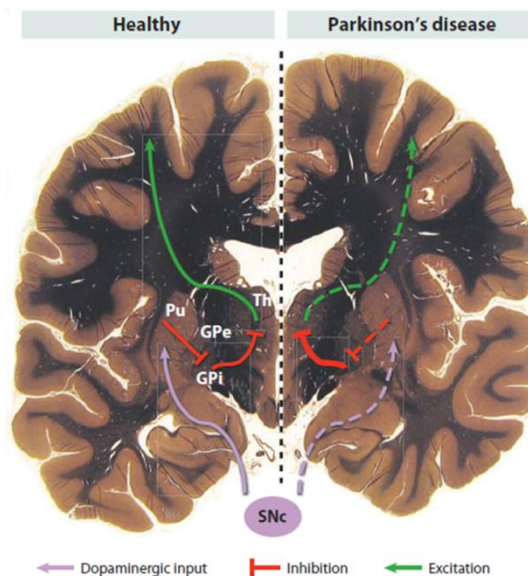
Die Hauptsymptome sind Bradykinesie (verlangsamte Bewegungen), Tremor (Muskelzittern), Rigor (Muskelstarre) sowie posturale Instabilität (Haltungsinstabilität), die häufig von nicht-motorischen Symptomen wie einer kognitiven Beeinträchtigung, Depressionen, vegetativen Funktionsstörungen, Geruchsverlust und Psychosen begleitet werden (Bekris *et al.*, 2010).

Pathologisch zeigt sich die Erkrankung durch den Verlust der nigrostriatalen dopaminergen Neuronen in der *substantia nigra pars compacta* (SNc). In gesunden Menschen projizieren die Zellkörper der durch Neuromelanin pigmentierten Neuronen in das Putamen des Gehirns. Von dort wird der *Globus pallidus interna* inhibiert, der im Folgenden den Thalamus hemmt. Dieser aktiviert wiederum den Cortex.

In Patienten ist die Anzahl der Neuronen in der SNc durch Degeneration und Atrophie verringert, so dass ein Ungleichgewicht der Transmitter in den Basalganglien entsteht, was in einer verminderten Aktivierung des Cortex resultiert (Shulman *et al.*, 2011; Abbildung 1). Die verringerte Erregung manifestiert sich in den Hauptsymptomen von Parkinson, da dieser Gehirnbereich für die Initiierung und Ausführung von Bewegungen zuständig

ist. Erste Symptome sind jedoch erst bei einem Verlust von 50% der nigralen Neuronen und einem 80%igen Rückgang des Dopaminlevels zu detektieren (Marsden, 1990).

Ein weiteres Hauptmerkmal ist die Bildung von Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten. Lewy-Körperchen sind eosinophile intracytoplasmatische Aggregate, die zum größten Teil aus dem Protein  $\alpha$ -Synuclein bestehen. Lewy-Neuriten sind Dendriten, die ebenfalls  $\alpha$ -Synuclein-Aggregate enthalten und im Hippocampus und der SNc vorkommen (Love, 2005).



**Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der Aktivierung und Inhibition der Basalganglien.** Im gesunden Menschen

(links) aktiviert die SNc das Putamen (Pu). Dieses inhibiert den *Globus pallidus interna* (GPi), welcher wiederum den Thalamus (Th) hemmt. Der Thalamus aktiviert zum Schluss den Cortex. In Parkinsonpatienten (rechts) führt die Degeneration der SNc zu einer verstärkten Inhibition des Thalamus und als Folge dessen zu einer verminderten Aktivierung des Cortex (Shulman *et al.*, 2011).



Eine Heilung der Erkrankung ist zurzeit nicht möglich, so dass nur die Symptome behandelt und abgemildert werden können. Bei der Behandlung in den Anfangsstadien der Krankheit kommen hauptsächlich Dopaminantagonisten, Anticholinergika und Amantadin zum Einsatz. Im weiteren Verlauf wird jedoch auf das effektivere Medikament Levodopa zurückgegriffen, das auf Grund seiner Nebenwirkungen erst möglichst spät verabreicht wird (Samii *et al.*, 2004).

## 1.2 Familiäres Parkinson Syndrom

Eine genetische Prädisposition für die Parkinsonerkrankung wurde lange Zeit ausgeschlossen und Umweltfaktoren als Ursache angenommen. Heute weiß man, dass 5-10% der Patienten unter einer monogenetischen Form von Parkinson leiden (Belin und Westerlund, 2008). Zum jetzigen Zeitpunkt sind 18 PARK Loci durch Kopplungsanalysen oder genomweite Assoziationsstudien (GWAS) bekannt, von denen sieben mit einer autosomal-dominanten und sechs mit einer autosomal-rezessiven Form von Parkinson in Verbindung gebracht werden (s. Tabelle 1).

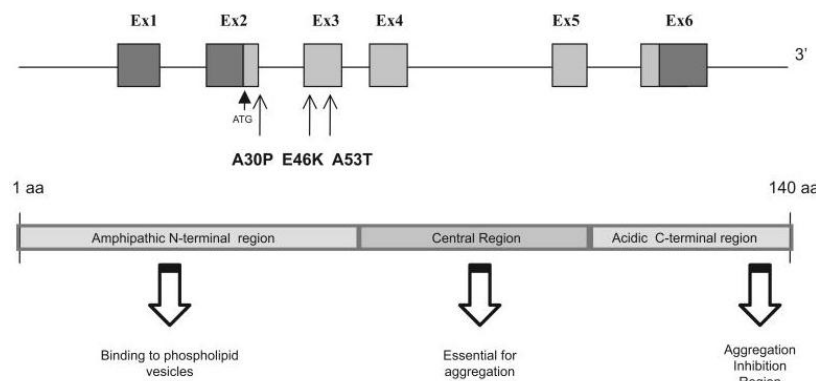
PARK Locus	Gen	Position	Vererbung	Parkinsonart
PARK1/4	<i>SNCA</i>	4q21	AD	EOPD
PARK2	<i>parkin</i>	6q25-q27	AR	Juvenile, EOPD
PARK3	-	2p13	AD	LOPD
PARK5	<i>UCHL1</i>	4p13	AD	LOPD
PARK6	<i>PINK1</i>	1p35-p36	AR	EOPD
PARK7	<i>DJ-1</i>	1p36	AR	EOPD
PARK8	<i>LRRK2</i>	12q12	AD	LOPD
PARK9	<i>ATP13A2</i>	1p36	AR	Kufor-Rakeb Syndrom
PARK10	-	1p32	AD	LOPD
PARK11	<i>GIGYF2</i>	2q36-q37	AD	LOPD
PARK12	-	Xq21-q25	X-linked	-
PARK13	<i>Omi/HTRA2</i>	2p12	AD	-
PARK14	<i>PLA2G6</i>	22q12-q13	AR	Juvenile levodopa-responsive dystonia-parkinsonism
PARK15	<i>FBXO7</i>	22q12-q13	AR	Earl-onset parkinsonian pyramidal syndrome
PARK16	-	1q32	-	-
PARK17	<i>GAK</i>	4p16	-	-
PARK18	<i>HLA-DRA</i>	6p21.3	-	-

**Tabelle 1: Übersicht über die bekannten Parkinsonloki.** EOPD: *Early-onset Parkinson disease*; LOPD: *Late-onset Parkinson disease*; AD: autosomal dominant; AR: autosomal rezessiv (Abgeändert nach Fujioka und Wszolek, 2012; Lesage und Brice, 2012).

### 1.2.1 $\alpha$ -Synuclein

Das erste Gen, das mit einer vererbaren Form von Parkinson in Verbindung gebracht wurde, war  $\alpha$ -Synuclein. Die erste Mutation A53T wurde in einer italienischen und in drei

griechischen Familien gefunden, in denen Parkinson mehrfach vorkam (Polymeropoulos *et al.*, 1997). Zwei weitere Mutationen konnten in einer deutschen (A30P) und einer spanischen Familie (E46K) identifiziert werden (Krüger *et al.*, 1998; Zarranz *et al.*, 2004; Abbildung 2). Des Weiteren wurden Duplikationen und Triplikationen des  $\alpha$ -Synuclein-Lokus in Patienten entdeckt. Da sich die Symptome bei Duplikationen im Gegensatz zu Triplikationen nicht so



**Abbildung 2: Gen- und Proteinstruktur von  $\alpha$ -Synuclein.** Alle drei Punktmutationen sind eingezeichnet. Das Protein kann in drei Regionen unterteilt werden. Ex: Exon; aa: Aminosäure (Bekris *et al.*, 2010).

stark ausprägen und eher einer idiopathische Parkinsonerkrankung ähneln, wird ein *gene dosage effect* vermutet (Singleton *et al.*, 2003; Chartier-Harlin *et al.*, 2004).

$\alpha$ -Synuclein besitzt auf Grund der hydrophoben Domäne im zentralen Proteinbereich die Eigenschaft zu Fibrillen zu kondensieren. Mutationen verändern die Proteinstruktur

und führen zu einer erleichterten Oligomerisierung und Fibrillenbildung (Conway *et al.*, 1998). Die Funktion von  $\alpha$ -Synuclein ist noch nicht vollständig geklärt, doch bisherige Ergebnisse zeigen, dass das Protein an die Plasmamembran bindet und eine wichtige Funktion beim Vesikeltransport in Synapsen ausübt (Auluck *et al.*, 2010).

### 1.3 Kufor-Rakeb Syndrom

Das Kufor-Rakeb Syndrom (KRS) wurde erstmals 1994 von Najim al-Din *et al.* in einer jordanischen Familie beschrieben. Neben den klassischen Parkinsonsymptomen (s. 1.1) zeigten die fünf Geschwister Anzeichen von Demenz und supranukleärer Blickparese. Die Symptome traten in einem Alter zwischen 11 und 16 Jahren auf und nahmen einen progressiven Verlauf. Mittels Magnetresonanztomographie (MRT) konnte eine Degeneration des *Globus pallidus*, der Pyramidenbahn und im späten Stadium der Krankheit des gesamten Gehirns festgestellt werden. In weiteren Patienten wurden u.a. Dysarthrie (Sprechstörungen), Myoklonien (Zuckungen) von Gesicht und Fingern, Schlaflosigkeit sowie das Fehlen von posturalen Reflexen festgestellt (Behrens *et al.*, 2010). Diese Symptome variieren zwischen den Patienten, so dass ein heterogenes Krankheitsbild entsteht. Eine Behandlung mit Levodopa beeinflusst die Bradykinese und den Rigor positiv, hat jedoch keinen Effekt auf die Pyramiden (Williams *et al.*, 2005).

Der verantwortliche Bereich für das Syndrom konnte sieben Jahre später identifiziert werden und liegt in einer 9 cM Region des Chromosoms 1p36 (Hampshire *et al.*, 2001). Die Mutationen befinden sich im Gen ATP13A2 (PARK9) und werden autosomal rezessiv vererbt (Ramirez *et al.*, 2006). Sie treten sowohl homozygot als auch transheterozygot auf. In den letzten Jahren konnten weitere Mutationen des PARK9 Locus identifiziert werden (s. Tabelle 2).

Mutation	Alter	Geschlecht	motorische Symptome	Gehirnbilder	Referenz
1632_1653dup22 (552LeufsX788)	12	männlich	B, R, PI	diffuse Atrophie	(Ramirez <i>et al.</i> , 2006), (Mao <i>et al.</i> , 2010)
	15	männlich	B, R, PI	diffuse Atrophie	
	13	männlich	B, R, PI	diffuse Atrophie	
	12	weiblich	B, R, PI	keine Daten	
c.3057delC (p.1019GfsX1021) c.1306+5G>A (p.G399 L435del)	18	männlich	T, B, R	vergrößerter Sulcus	(Ramirez <i>et al.</i> , 2006), (Lesage und Brice, 2009)
	17	männlich	T, B, R, PI	milde, diffuse Atrophie, Hyperintensität des Nucleus caudatus	
	15	weiblich	T, B, R, PI	keine Daten	
	12	männlich	T, B, R, PI	diffuse Atrophie	
c.1510G>C (Gly504Arg) c.35C>T (Thr12Met) c.1597C>A (Gly533Arg)	12	männlich	B, R, PI	diffuse Atrophie	(Di Fonzo <i>et al.</i> , 2007)
	30	männlich	T, B, R, PI	keine Daten	
	40	männlich	B, R, PI	keine Daten	
c.746C>T (Ala249Val) c.844A>T (Ser282Cys) c.1346G>A (Arg449Gln) c.2939G>A (Arg980His)	31	weiblich	T, B, R, PI	normal	(Djarmati <i>et al.</i> , 2009)
	20	männlich	R, PI	normal	
	36	männlich	B, R, PI	cerebrale Atrophie	
	35	weiblich	T, B, R, PI	normal	
c.1103_1104insGA (p.Thr367fsX29)	16	männlich	B, R, PI	diffuse Atrophie	(Schneider <i>et al.</i> , 2010)
c.2742_2743delTT (p.F851CfsX856)	10	männlich	B, R, PI	diffuse Atrophie, bilaterale Hyper-intensität von Putamina und Nucleus caudatus	(Crosiers <i>et al.</i> , 2011)
c.1108_1120del13 (p.Arg370fsX390)	6	männlich	B, R, PI	normal	(Fong <i>et al.</i> , 2011)
c.2473C>AA, (p.Leu825AsnfsX32)	27	weiblich	keine Daten	diffuse Atrophie	(Eiberg <i>et al.</i> , 2012)
	24	männlich	keine Daten	diffuse Atrophie	
	12	männlich	B, R	normal	
	10	weiblich	T, B, R	keine Daten	
	29	weiblich	PI	diffuse Atrophie	
	15	weiblich	T, B, R	keine Daten	
c.2762C>T (p.Gln858*)	14	weiblich	T, B, R, PI	diffuse Atrophie	(Malakouti-Nejad <i>et al.</i> , 2014)
	10	männlich	T, B, R, PI	diffuse Atrophie	
	30	männlich	T, B, R, PI	keine Daten	
c.2629G>A (Gly877Arg)	10	männlich	B, R, PI	diffuse Atrophie	(Santoro <i>et al.</i> , 2011)
c.546C>A (Phe182Leu)	22	weiblich	T, B, R, PI	diffuse Atrophie	(Ning <i>et al.</i> , 2008)
c.2236G>A (Ala746Thr)	53	weiblich	T, B, R	normal	(Lin <i>et al.</i> , 2008)
	50	männlich	T, B, R, PI	normal	
	39	männlich	T, B, R, PI	normal	
c.3274A>G (p.Gly1014Ser) c.2236G>A (Ala746Thr) c.2236G>A (Ala746Thr)	48	weiblich	T, B, R, PI	normal	(Chen <i>et al.</i> , 2011)
	49	männlich	T, B, R, PI	keine Daten	
	51	weiblich	T, B, R, PI	keine Daten	
c.3176C>G (Leu1059Arg) c.3253delC (L1085wfsX1088)	17	männlich	B, R	normal	(Park <i>et al.</i> , 2011)
	17	weiblich	B, R	normal	

**Tabelle 2: Übersicht über Mutationen und Symptome vom KRS.** B: Bradykinese; PI: Haltungsinstabilität; R: Rigor; T: Tremor (abgeändert nach Yang und Xu, 2014).

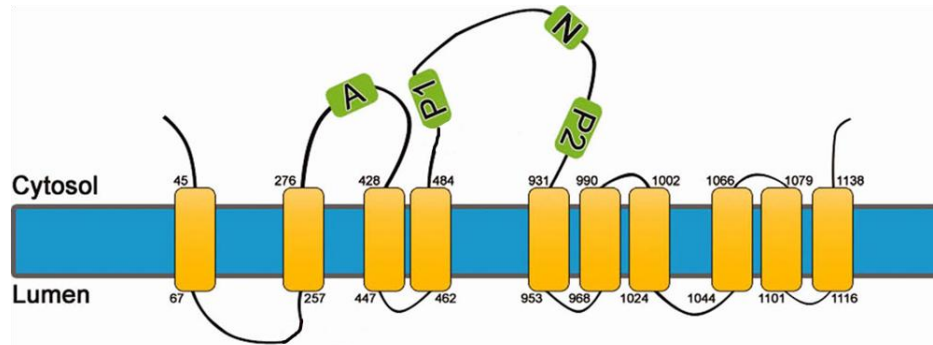
### 1.3.1 Proteinstruktur und Funktion von ATP13A2

Das Gen ATP13A2 besitzt 29 Exons und durch alternatives Spleißen entstehen drei verschiedene ATP13A2-Transkripte und Proteine. Die Isoform-1 codiert für ein Protein mit 1180 Aminosäuren (~ 130 kDa) und ist die längste der drei Isoformen. Isoform-2 ist auf Grund einer *in-frame* Deletion am N-Terminus um fünf Aminosäuren kürzer als Isoform-1. Die dritte Isoform besitzt zusätzlich eine weitere *in-frame* und eine *out-of-frame* Deletion, so dass sich der C-Terminus stark von denen der beiden anderen Isoformen unterscheidet. Dies führt zu einer veränderten Lokalisation und einer schnellen Degradation durch das Proteasom (Ugolino *et al.*, 2011).

Das Protein gehört zur Superfamilie der P-ATPasen, die auf Grund ihrer Substratspezifität in fünf Gruppen ( $P_1$ - $P_5$ ) unterteilt werden können. Die Untergruppen  $P_1$ - $P_3$  kommen sowohl in Pro- als auch in Eukaryoten vor, wohingegen  $P_4$  und  $P_5$  nur in Eukaryoten zu finden sind (Axelsen und Palmgren, 1998). Die am wenigsten erforschte Gruppe ist die der  $P_5$ -ATPasen, der fünf humane Gene zugeordnet werden können: *ATP13A1-5* (Schultheis *et al.*, 2004).

ATP13A2 gehört zur Kategorie der  $P_{5B}$ -ATPasen, die noch wenig beschrieben sind. Sie besitzen wie die  $P_{5A}$ -ATPasen die selbe Phosphorylierungsstelle, unterscheiden sich jedoch in der Ionenbindestelle voneinander (Møller *et al.*, 2008).

Der Vergleich von Kristallstrukturen von P-ATPasen ergab eine starke Ähnlichkeit in ihrem Aufbau. Dabei konnten drei wiederkehrende Hauptdomänen bestimmt werden: die Nukleotidbindedomäne (N), Phosphorylierungsdomäne (P) und die Aktuatordomäne (A), die sich im Cytosol befinden (Abbildung 3).



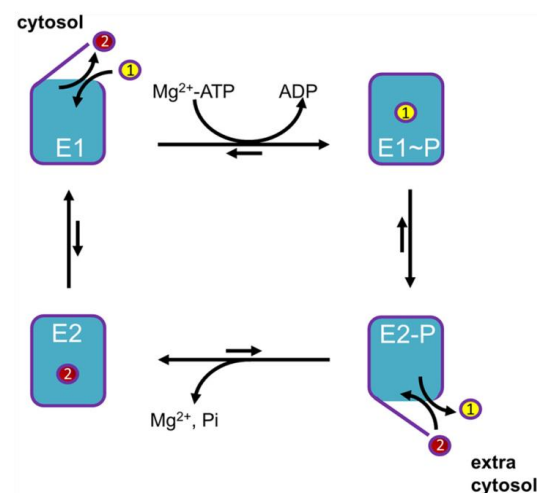
**Abbildung 3: Proteinstruktur von ATP13A2.** PARK9 besitzt zehn Transmembrandomänen und gehört zur P-Typ Superfamilie der ATPase-Transporter. A: Aktuatordomäne; P1 und P2: bilden zusammen die Phosphorylierungsdomäne; N: Nukleotidbindedomäne (abgeändert nach Covy *et al.*, 2012).

Der Transportzyklus beginnt mit der Bindung von ATP an die N-Domäne, die eine ATP-Tasche ausbildet. Die Domäne verfügt über ein konserviertes Sequenzmotiv (**KGAP**E), dessen Lysin mit dem Adeninring des ATP interagiert (van Veen *et al.*, 2014). Von den drei cytosolischen Domänen variiert die N-Domäne am stärksten in ihrer Sequenz und Größe (Toyoshima, 2009). Die N-Domäne überträgt dann das Phosphat auf ein Aspartat, welches zum Sequenzmotiv der P-Domäne gehört (**DKTG**). Dabei entsteht ein energiereiches Intermediat, das durch ein  $H_2O$ -Molekül der A-Domäne dephosphoryliert wird. Dieser Prozess wird durch das Glutamat des Sequenzmotivs (**TGES**) katalysiert (Bublitz *et al.*, 2011; Palmgren und Nissen, 2011).

Der Transport von Kationen gegen einen Konzentrationsgradienten stellt bestimmte Anforderungen an den Transporter um den Rückfluss der Ionen zu verhindern. Um dieses Problem zu umgehen, arbeiten Membranpumpen nach einem „*alternating-access*“-Modell (Jardetzky, 1966). Dabei erfolgt der Transport des Substrats über eine Zwischenstufe, bei der beide Seiten der Membran geschlossen sind. Die Translokation der Ionen erfolgt durch Konformationsänderungen der ATPase.

Der Transportmechanismus von ATPasen findet nach dem Post-Albers Modell statt und läuft über vier Konformationszustände: E1, E1-P, E2-P und E2 (Albers, 1967).

Der E1-Zustand besitzt eine hohe Affinität gegenüber dem Substrat auf der cytosolischen Seite. Nach dessen Bindung erfolgen die Autophosphorylierung durch ATP und der Übergang in den energiereichen E1-P-Zustand. Dieser durchläuft eine Konformationsänderung zu E2-P, so dass sich die Affinität der Ionenbindestelle verringert und diese sich auf die extracytosolische Seite hin öffnet. Dadurch wird das Substrat freigesetzt und gleichzeitig Austauschionen gebunden. Infolgedessen wird der Transporter dephosphoryliert und schließt seine Öffnung zum Extrazellulärraum (E2). Der Übergang zu E1 führt zur Freisetzung der Austauschionen ins Cytosol und zur Reinitialisierung des Zyklus (Bublitz *et al.*, 2011; van Veen *et al.*, 2014; Abbildung 4).



**Abbildung 4: Transportmechanismus von ATPasen.** Das Substrat (1) bindet im E1-Zustand an die ATPase. Durch Autophosphorylierung entsteht der E1-P-Übergang, der im E2-P das Substrat (1) in den Extrazellulärraum entlässt und Austauschionen (2) bindet. Durch Dephosphorylierung geht die E2-Stufe in E1 über und setzt die Austauschionen (2) frei (van Veen *et al.*, 2014).

Obwohl die Substratspezifität von PARK9 bisher noch unbekannt ist, gibt es mehrere Hinweise, dass das Transmembranprotein an dem Transport von zweiwertigen Kationen beteiligt ist. Ein *knockdown* des PARK9 Homologs YPK9 in *S. cerevisiae* führt zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Zink, Mangan, Nickel und Selen (Gitler *et al.*, 2009; Schmidt *et al.*, 2009). In humaner Zellkultur sind eine erhöhte Sensitivität gegenüber Zink sowie ein Ungleichgewicht in der Zinkhomöostase in *ATP13A2*-defizienten Zellen von Parkinsonpatienten feststellbar. Die Zellen zeigen einen erhöhten Zinkgehalt, veränderte Expression von Zinktransportern und eine verminderte Aufnahme in Vesikel (Kong *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2014; Tsunemi und Krainc, 2014).

Zusätzlich zu dem Transport von Metallen gibt es noch eine weitere Hypothese über ein mögliches Substrat. Die Funktion des PARK9-Orthologs in *C. elegans* CATP-5 ist als Polyamintransporter oder als positiver Regulator der Polyaminaufnahme beschrieben (Heinick *et al.*, 2010). Des Weiteren wurde bei einem *Screen* nach potentiellen Zielproteinen für eine Krebsbehandlung CG32000 als Bestandteil eines Polyamintransportsystems in *Drosophila* identifiziert (Barnette *et al.*, 2012). Ein direkter Zusammenhang von Polyaminen mit PARK9 konnte in CHO-Zellen gezeigt werden, die sensitiver auf Paraquat reagieren, wenn sie *ATP13A2* exprimieren (Pinto *et al.*, 2012).

### 1.3.2 Proteinexpression und Lokalisation von ATP13A2

ATP13A2 wird im Menschen ubiquitär exprimiert, die stärkste Expression ist jedoch im Gehirn zu detektieren. Das Protein ist in allen Bereichen des Gehirns zu finden (u.a. *substantia nigra*, Thalamus, Putamen) und wird bereits auch im fetalen Gehirn exprimiert. *Northern Blot* Analysen von Mäusen zeigen ebenfalls eine breite Expression in verschiedenen Geweben. Besonders hohe RNA-Level können auch hier wieder im Gehirn detektiert werden (Schultheis *et al.*, 2004).

Des Weiteren ist die Menge an ATP13A2-mRNA in einzelnen überlebenden dopaminergen Neuronen in Parkinsonpatienten im Vergleich zur Kontrollgruppe um das 5-10-fache erhöht (Ramirez *et al.*, 2006). Auf Proteinebene kann ebenfalls ein Anstieg von ATP13A2 in dopaminergen sowie kortikal pyramidalen Neuronen in Parkinsonsgehirnen festgestellt werden (Ramonet *et al.*, 2012).

Die Lokalisation von ATP13A2 wurde als erstes von Ramirez untersucht, der in COS7-Zellen eine Kolokalisation mit den Markern Lysotracker bzw. LAMP2 in den Lysosomen nachweisen konnte (Ramirez *et al.*, 2006).

Dies wurde in den folgenden Jahren von weiteren Arbeitsgruppen in verschiedenen Zellkulturmodellen bestätigt (Park *et al.*, 2011; Tan *et al.*, 2011; Ugolino *et al.*, 2011; Matsui *et al.*, 2013). Untersuchungen in primären Kortikalneuronen aus Ratten zeigten eine Übereinstimmung des exogenen ATP13A2-V5 mit den Markern LAMP-1-RFP (Lysosomen), RFP-Rab5A (frühe Endosomen) und GFP-Rab7A (späte Endosomen). In geringem Maße ist auch eine Kolokalisation mit dem Autophagiemarker GFP-LC3 feststellbar (Ramonet *et al.*, 2012).

Eine aktuelle Studie untersuchte die Lokalisation von endogenem ATP13A2 in differenzierten SHSY5Y-Zellen sowie in primären Neuronen von Ratten und fand diese in *multivesicular bodies* (MVBs), die nur mit dem Marker LC3 kolokalisierten (Kong *et al.*, 2014). MVBs sind eine spezielle Gruppe von späten Endosomen und werden auf Grund ihres Aussehens so genannt (Katzmann *et al.*, 2002).

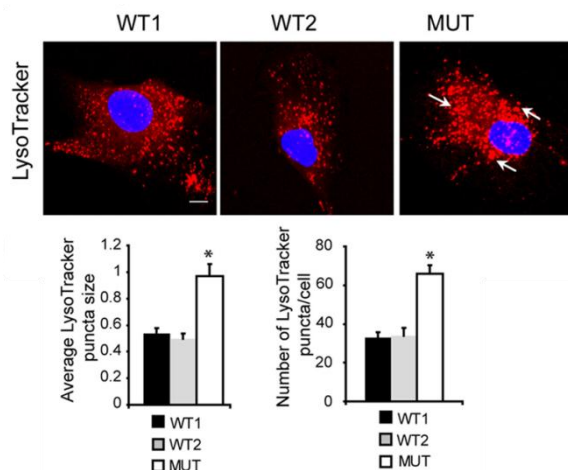
In Bezug auf die drei verschiedenen Isoformen des humanen ATP13A2 (s. 1.3.1) ist die Isoform-1 in den Lysosomen lokalisiert, während Isoform-3 im endoplasmatischen Retikulum (ER) verbleibt und schnell abgebaut wird. Isoform-2 wurde nicht untersucht; es wird jedoch davon ausgegangen, dass sie auf Grund der hohen Ähnlichkeit mit Isoform-1 ebenfalls in den Lysosomen lokalisiert ist (Ugolino *et al.*, 2011).

### 1.3.3 Pathophysiologie von KRS

Mutante Formen von ATP13A2 sind nicht wie die wildtypische Form in den Lysosomen lokalisiert (s.1.3.2), sondern verbleiben im ER und werden über den ER-assoziierten Proteindegradationsweg (ERAD) abgebaut. Dies führt dazu, dass der proteasomale Abbauweg permanent überlastet ist und die Zellen unter ER-Stress stehen. Da kein funktionelles ATP13A2 die Lysosomen erreicht, liegt es vermutlich nahe, dass die Funktion des Organells gestört ist (Park *et al.*, 2011; Ugolino *et al.*, 2011).

Der Einfluss von Mutationen auf die Proteinstabilität wurde von Podhajska *et al.* (2012) in HEK-293T Zellen untersucht. Dabei zeigte sich, dass homozygote Mutationen auf Grund ihrer geringen Stabilität durch das Proteasom abgebaut werden. Des Weiteren sind diese Proteine nicht mehr in den Lysosomen lokalisiert, sondern befinden sich im ER.

Heterozygote Mutationen beeinflussen weder die Proteinstabilität noch dessen Lokalisation, resultieren jedoch in einer geringeren ATPase-Aktivität in den Lysosomen.



**Abbildung 5: Zunahme der Größe und Anzahl von LysoTracker-positiven Vesikeln in Fibroblasten von KRS-Patienten.** WT1 und 2: Wildtyp Fibroblasten, MUT: Fibroblasten mit einer *ATP13A2*-Mutation. Pfeile markieren vergrößerte Vesikel (Usenovic *et al.*, 2012).

Tatsächlich zeigen Fibroblasten von KRS-Patienten vergrößerte Lysosomen, die auf Grund eines zum Basisch veränderten pH-Werts eine verminderte Proteaseaktivität und damit eine reduzierte Degradation von lysosomalen Substraten aufweisen (Dehay *et al.*, 2012; Usenovic *et al.*, 2012; Abbildung 5).

Die Beeinträchtigung der Lysosomenfunktion führt zu Akkumulation von  $\alpha$ -Synuclein in primären Korkal-neuronen und weist auf eine Interaktion von zwei PARK-Loki hin (Usenovic *et al.*, 2012). Die Expression des *ATP13A2*-Orthologs *YPK9* in *S. cerevisiae* verhindert die Akkumulation von  $\alpha$ -Synuclein und stellt die wildtypische Lokalisation des Proteins wieder her. Auch in *C. elegans* und in primären Zellkultureuroneen kann dieser

schützende Effekt vor der Toxizität von  $\alpha$ -Synuclein beobachtet werden. Für mutante *YPK9*-Proteine gilt dies nicht, da sie entweder falsch lokalisiert sind oder keine Aktivität aufweisen (Gitler *et al.*, 2009).

Die Beeinträchtigung der lysosomalen Funktion zieht weitere Auswirkungen mit sich. Der *knockdown* von *ATP13A2* in Neuronen führt zu einer Erhöhung der Mitochondrienmasse, verstärkter Fragmentierung der Mitochondrien, einer Steigerung der Atmung und der Produktion von reaktiven oxigenen Spezies (ROS) (Grünwald *et al.*, 2012; Gusdon *et al.*, 2012). Untersuchungen der Autophagie zeigen eine verminderte Aktivierung auf Grund einer geringeren Induktion. Zusammenfassend wird vermutet, dass die *ATP13A2*-Defizienz die Autophagie beeinträchtigt und sich indirekt auch auf die Mitochondrienfunktion auswirkt (Gusdon *et al.*, 2012).

Mutationen in *ATP13A2* sind nicht nur auf Parkinsonpatienten beschränkt, sondern wurden auch in Patienten mit neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen (NCLs) gefunden (Bras *et al.*, 2012). In Tiermodellen zeigt sich, dass tibetische Terrier, die an NCLs leiden, eine Mutation in *ATP13A2* aufweisen (Wöhlke *et al.*, 2011; Farias *et al.*, 2011). Des Weiteren entwickeln *ATP13A2*-defiziente Mäuse NCLs,  $\alpha$ -Synuclein-Akkumulation und altersabhängige motorische Störungen (Schultheis *et al.*, 2013).

NCLs sind eine Gruppe von neurodegenerativen Erkrankungen, die durch die Akkumulation von autofluoreszierendem Lipofuszin in Lysosomen u.a. in neuronalem Gewebe gekennzeichnet sind. Häufig führt dies zu motorischen Störungen, Demenz, Krämpfen und Sehproblemen (Jalanko und Braulke, 2009; Schultheis *et al.*, 2013). Die Krankheit entsteht durch Mutationen in Genen, die für Proteine codieren, die entweder in den Endosomen/Lysosomen oder dem ER lokalisiert sind (Weimer *et al.*, 2002; Kyttälä *et al.*, 2006). Beide Erkrankungen verbindet die Dysfunktion der Lysosomen und daraus resultierend die ineffiziente Degradation von Proteinen. Somit kann vermutet werden, dass Parkinson und NCLs über denselben pathogenen Mechanismus verfügen.

## 1.4 Proteindegradation

Die Degradation von alten und fehlgefalteten Proteinen ist für die Homöostase der Zelle von größter Wichtigkeit. In Eukaryoten sind das Ubiquitin-Proteasom- und das Autophagie-Lysosomen-System die beiden Hauptwege um Proteine und Organelle abzubauen.

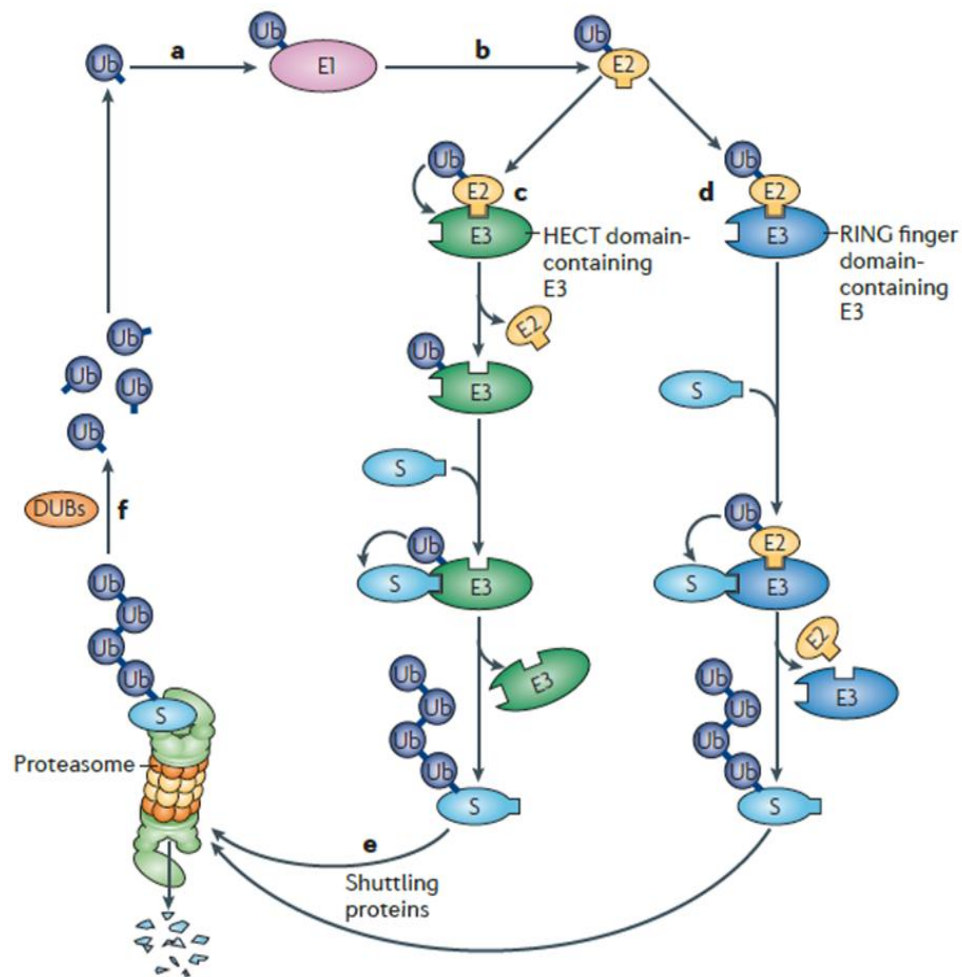
### 1.4.1 Das Ubiquitin-Proteasom System

Das Ubiquitin-Proteasom System (UPS) ist für die Degradation von kurzlebigen und fehlgefalteten löslichen Proteinen zuständig. Dabei werden sowohl Kernproteine als auch cytosolische Proteine abgebaut (Hershko und Ciechanover, 1998).

Der Prozess lässt sich in zwei Schritte aufteilen: Zuerst markiert das Ubiquitinsystem ausgewählte Proteine durch Ubiquitinierung für den Abbau. Das 26S Proteasom führt im Anschluss die eigentliche Degradation aus und setzt zum Schluss einzelne Ubiquitinmoleküle wieder frei (Jansen *et al.*, 2014).

Die Kaskade beginnt, indem ein durch ATP-aktiviertes Ubiquitin über eine Thioesterbindung mit dem ubiquitinaktivierenden Enzym (E1) verbunden wird. Ubiquitin wird im Anschluss wieder über eine Thioesterbindung auf das ubiquitinkonjugierende Enzym (E2) übertragen. Zwei unterschiedliche Wege existieren um das Ubiquitin auf das Substrat zu übertragen: Die Familie der HECT-Ubiquitinligasen (E3) bindet an E2 und Ubiquitin wird erst auf E3 übertragen bevor es auf das Substrat transferiert wird. E3-Ligasen mit einer RING-Finger-Domäne hingegen übertragen das Ubiquitin direkt auf das Substrat. Durch mehrfache Wiederholung dieser Kaskade entsteht eine Ubiquitinkette und das Substrat wird im Folgenden über das Proteasom abgebaut (Weissman *et al.*, 2011; Atkin und Paulson, 2014; Abbildung 6).





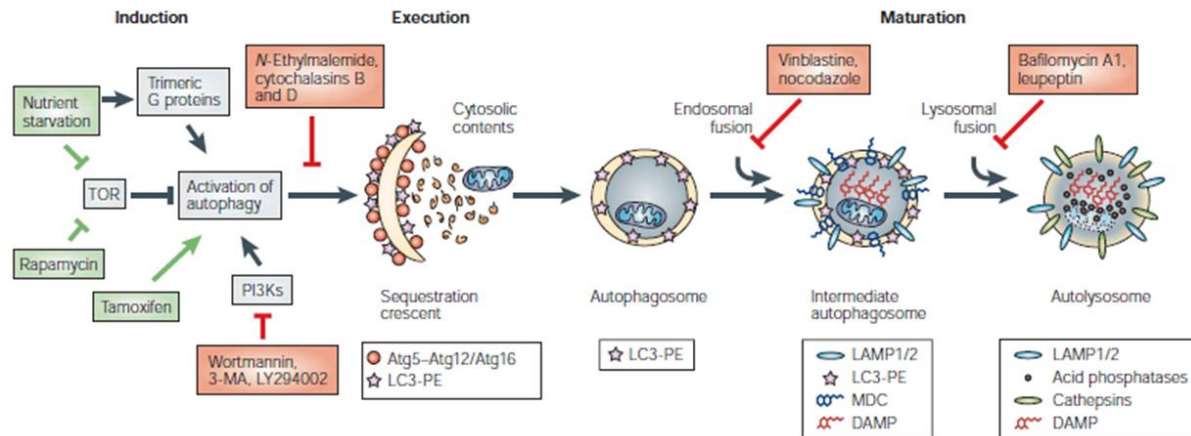
**Abbildung 6: Übersicht über das UPS.** a) Ubiquitin wird durch das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1) aktiviert. b) Ubiquitin wird auf das Ubiquitin-konjugierte Enzym (E2) übertragen. c) Von E2 kann Ubiquitin entweder auf eine Ubiquitin-Proteinligase mit einer HECT-Domäne (E3) übertragen werden und von dort auf ein Substrat (S) oder d) von E2 direkt auf ein Substrat, das an eine Ubiquitinligase mit RING-Finger-Domäne (E3) gebunden ist. Die Substrate werden in mehreren Runden mit weiteren Ubiquitinen versehen. e) Abbau der Ubiquitin-konjugierten Substrate über das 26S Proteasom. f) Der größte Teil der Ubiquitinkette wird über deubiquitinierende Enzyme (DUBs) zerlegt (Weissman *et al.*, 2011).

### 1.4.2 Autophagie

Mit Hilfe der Autophagie können langlebige Proteine und Organellen der Zelle abgebaut werden. Im Gegensatz zum UPS ist dieser Abbauweg in seiner Funktion auf das Cytosol beschränkt und kann in drei Arten unterteilt werden: Mikrophagie, Makrophagie und durch Chaperone vermittelte Autophagie.

Die Mikrophagie ist ein unselektiver Abbauprozess, bei dem cytosolisches Material direkt von der lysosomalen Membran umschlossen wird (Rubinsztein *et al.*, 2005). Studien mit *S. cerevisiae* lassen vermuten, dass dieser Prozess unter Stickstoffmangel zur Aufrechterhaltung der Organellgröße, der Membranzusammensetzung und des Zellüberlebens beiträgt (Roberts *et al.*, 2003). Chaperon vermittelte Autophagie ist ein selektiver Prozess, in dem das *heat shock protein 70* (Hsp70) an eine spezielle Aminosäuresequenz (KFERQ) des Substrats und dieser Komplex an einen lysosomalen Rezeptor bindet (z.B. LAMP-2A). Das Protein wird entfaltet und passiert die Membran ins lysosomale Lumen, wo es abgebaut wird (Dice, 1990; Cuervo und Dice, 1996).

Die Makroautophagie ist der am besten beschriebene der drei Typen und wird allgemein als Autophagie bezeichnet. In Säugetieren wird die Autophagie während eines Nährstoffmangels durch Aminosäuren und Hormone wie Insulin und Glukagon induziert (Mortimore *et al.*, 1989; Abbildung 7).



**Abbildung 7: Der Autophagiesignalweg.** Die Induktion der Autophagie kann durch Nährstoffmangel oder z.B. die Behandlung mit Rapamycin ausgelöst werden. Die Kinase TOR (*target of rapamycin*) wird durch Dephosphorylierung inaktiviert und der Autophagiesignalweg dadurch aktiviert. Proteine und Organelle werden von einer Phagophore umschlossen und bilden ein Autophagosom aus. Das Autophagosom fusioniert mit Endosomen und Lysosomen zur Bildung des Autolysosoms, in dem das Material abgebaut wird (Kirkegaard *et al.*, 2004).

Diese Signale bewirken die Dephosphorylierung der Kinase TOR (*target of rapamycin*) und damit die Aktivierung des Autophagiesignalwegs. Cytoplasmatische Proteine und Organelle werden von einer doppelschichtigen Membran umschlossen und bilden das Autophagosom. Die Fusion mit Endo- und Lysosomen führt zur Ansäuerung des pH-Werts und der Bildung des Autolysosoms. Die sauren Proteasen bauen im Anschluss die Zellbestandteile ab (Cuervo *et al.*, 2005).

### 1.4.3 Proteindegradation und Parkinson

Postmitotische Neuronen sind nicht mehr in der Lage sich zu teilen und daher auf die Entfernung von fehlgefalteten und alten Proteinen angewiesen (Ortega und Lucas, 2014). Mutationen in Komponenten in einem der beiden Hauptabbauewege würden die Funktion von Nervenzellen negativ beeinflussen. Die richtige Funktion der Degradationsabläufe ist von großer Bedeutung für verschiedene Prozesse des Nervensystems wie z.B. neuronale Plastizität und Gedächtnis (Fonseca *et al.*, 2006).

Von allen neurodegenerativen Erkrankungen ist Parkinson die einzige, bei der Mutationen in Proteinen gefunden wurden, die im Zusammenhang zum UPS stehen.

Das Gen *UCHL-1* (PARK5) kodiert für das am häufigsten im Gehirn vorkommende lösliche neuronale Protein und ist ausschließlich in Neuronen zu finden (Wilkinson *et al.*, 1989). Es ist ein deubiquitinierendes Enzym (DUB) und erfüllt mehrere Funktionen: Es entfernt Ubiquitin von kleinen oder fehlgefalteten Proteinen, stabilisiert monoubiquitinierte Proteine, zerlegt Polyubiquitinketten in ihrer einzelnen Bestandteile und besitzt zusätzlich noch eine

Ligaseaktivität (Liu *et al.*, 2002; Setsuie und Wada, 2007). Eine Beeinträchtigung der Proteinfunktion durch Mutationen kann sich auf die Effizienz des UPS auswirken und zu einer Akkumulation von Proteinen führen, die nicht mehr schnell genug abgebaut werden können.

*Parkin* (PARK2) ist eine Ubiquitinligase (E3), dessen *loss-of function* Mutationen mit einer frühen Form von Parkinson in Verbindung gebracht werden und deren Proteinaktivität in Patienten verringert ist (Shimura *et al.*, 2000). Es konnte gezeigt werden, dass  $\alpha$ -Synuclein ( $\alpha$ -SP22) in einer nicht-ubiquitinierten Form in Gehirnen von *Parkin*-defizienten Patienten akkumuliert. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass dieses spezielle  $\alpha$ -Synuclein ein Substrat für die Ubiquitinligase ist und diese für den Abbau benötigt wird. Zusätzlich wird eine Verbindung mit einem Parkinsonsogen sichtbar (Shimura *et al.*, 2001).

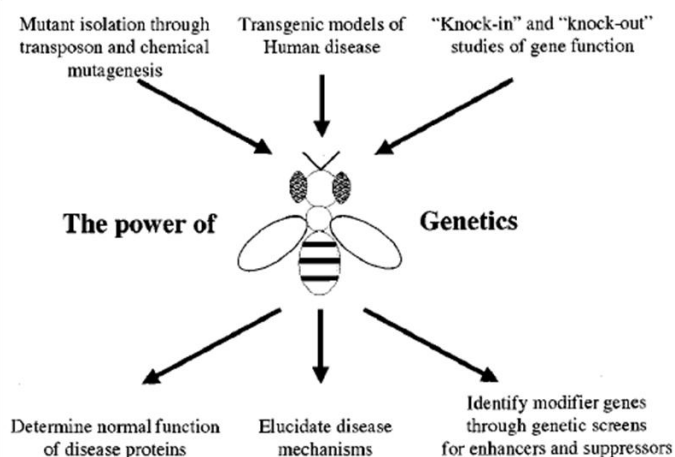
Am besten untersucht ist jedoch die Interaktion von *Parkin* und PINK1 (PTEN-induzierte putative Proteinkinase/PARK6). Beide Enzyme spielen eine wichtige Rolle bei der Degradation von defekten Mitochondrien (Mitophagie) und interagieren im selben Signalweg. In gesunden Mitochondrien wird PINK1 konstitutiv über den TIM/TOM Komplex in die innere Mitochondrienmembran importiert und durch mehrere Proteasen wie z.B. MPP (*mitochondrial-processing protease*) oder PARL (*presenilin-associated rhomboid-like protease*) abgebaut (Deas *et al.*, 2011; Greene *et al.*, 2012). Sinkt das Membranpotential der Mitochondrien, akkumuliert PINK1 selektiv in der äußeren Membran und führt zur Translokation von *Parkin* aus dem Cytosol zu depolarisierten Mitochondrien und der Induzierung der Mitophagie (Narendra *et al.*, 2010).

Ein wesentliches Merkmal von Parkinson ist die Bildung von Lewy-Körperchen, deren Hauptbestandteil  $\alpha$ -Synuclein ist (s. 1.1). Doch auch weitere Moleküle wie Ubiquitin konnten identifiziert werden. Ursprünglich wurde angenommen, dass  $\alpha$ -Synuclein ausschließlich über das UPS abgebaut wird. In den letzten Jahren zeigte sich jedoch, dass dieses Protein abhängig von seiner Konformation auch über Chaperon-vermittelte Autophagie degradiert wird (Webb *et al.*, 2003). Während wildtypisches  $\alpha$ -Synuclein effektiv abgebaut wird, werden Mutanten nur langsam entfernt. Obwohl sie eine hohe Affinität gegenüber dem Chaperon-vermittelten Autophagierezeptor aufweisen, findet keine Translokation in die Lysosomen statt. Zusätzlich blockieren diese Mutanten die Aufnahme weiterer Degradationssubstrate über diesen Rezeptor. Als Folge wird die Makroautophagie aktiviert, so dass letztendlich beide Abbauewege überlastet und nicht mehr in der Lage sind die normale Degradationsmenge durchzuführen (Cuervo *et al.*, 2004).

*In vivo* wird  $\alpha$ -Synuclein hauptsächlich über das UPS abgebaut. Die Autophagie wird bei vermehrter  $\alpha$ -Synuclein-Expression aktiviert und sorgt für dessen Degradation. Beide Wege sind funktionell miteinander verbunden, so dass bei einer Beeinträchtigung des einen Weges der andere diesen kompensieren kann (Ebrahimi-Fakhari *et al.*, 2011).

## 1.5 *Drosophila* als Modellorganismus für neurodegenerative Erkrankungen

Das Modell der Fruchtfliege zeichnet sich nicht nur durch die kurze Generations- und Lebenszeit, eine große Anzahl an Nachkommen und kostengünstige Haltung aus, sondern auch durch die Verfügbarkeit von verschiedenen Manipulationsmethoden der Genexpression (Abbildung 8). Neben der bekannten Anatomie und Phänotypen ist die Konservierung wichtiger Signalwege wie Wnt und Toll-*like* ein weiterer Vorteil, den dieses Modell bietet. Die komplette Sequenzierung des *D. melanogaster* Genoms im Jahr 2000 erleichterte die Suche nach orthologen Genen (Adams *et al.*, 2000).



**Abbildung 8: Methoden zur Untersuchung der Genfunktion in *D. melanogaster*.** Die Funktion orthologer Gene kann durch klassische Mutagenese sowie transgenetische und reverse Methoden analysiert werden. In transgenen Fliegen kann die Funktion von Krankheitsgenen untersucht werden. Genetische Screens führen zur Entdeckung von Genen, die die Pathogenese beeinflussen (Chan und Bonini, 2000).

Durch proteomische Analysen konnte gezeigt werden, dass für über 75% von humanen Krankheitsgenen ein eindeutiges Ortholog in *D. melanogaster* existiert (Reiter *et al.*, 2001). Wichtige zelluläre Prozesse wie neuronale Kommunikation, Synaptogenese und Zelltod sowie die neurobiologischen Grundlagen des Verhaltens sind in *Drosophila* und Menschen ähnlich (Hirth, 2010). Fliegen verfügen über ein komplexes Nervensystem und Gehirn und sind daher auch für pharmakologische Screens von Bedeutung (Bilen und Bonini, 2005).

Die Expression von humanen Krankheitsgenen zur Untersuchung der funktionellen Eigenschaften und deren Rolle in neurodegenerativen

Prozessen ist eine Möglichkeit den Modellorganismus zu nutzen. Hierbei wird das *UAS-GAL4*-System verwendet, welches die Expression eines beliebigen Gens in bestimmten Zellen oder Geweben zu einem definierten Zeitpunkt ermöglicht (Brand und Perrimon, 1993). Feany und Bender exprimierten im Jahr 2000 das in Parkinson relevante wildtypische  $\alpha$ -Synuclein sowie zwei Mutanten (A30P und A53T) im Gehirn von *D. melanogaster*. Eine Anti-Tyrosinhydroxylase (Th)-Färbung an Paraffinschnitten zeigte den altersabhängigen Verlust von dopaminergen Neuronen und die Bildung von cytoplasmatischen Einschlüssen. Außerdem war die lokomotorische Aktivität gestört. Der *knockdown* von Genen erfolgt mittels RNA-Interferenz oder der Erzeugung von Nullmutanten. So konnte in *Parkin*-Nullmutanten die Degeneration der indirekten Flugmuskulatur, eine verringerte Lebensdauer und lokomotorische Defekte festgestellt werden, die durch eine Fehlfunktion der Mitochondrien hervorgerufen werden (Greene *et al.*, 2003; Pesah *et al.*, 2004). Auch Untersuchungen im Bezug auf pharmakologische Wirksamkeit von Substanzen sind in *Drosophila* möglich. Substrate werden unter das Futter gemischt und erlangen auf Grund einer durchlässigen Blut-Hirn-Schranke einen einfachen Zugang zum ZNS. Verschiedene Toxine wurden bereits auf diese Weise auf ihre Bedeutung bei Parkinsonsymptomen hin untersucht (Betarbet *et al.*, 2002).

Parkinson ist nicht die einzige neurodegenerative Erkrankung, die mit Hilfe der Fruchtfliege untersucht wurde. Polyglutaminerkrankungen wie z.B. Chorea Huntington zeigten bei der Expression von verkürztem wildtypischen oder mutiertem Huntington in der Fliege, dass die Schwere der Degeneration und die Proteinaggregation zum einen von der Länge der Wiederholungen und zum anderen vom Alter abhängig ist (Jackson *et al.*, 1998).

Ein Modell für Alzheimer zu erstellen, erwies sich hingegen als schwieriger, da nicht alle Komponenten für die proteolytische Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins (APP) in *Drosophila* konserviert sind (Bilen und Bonini, 2005). Dennoch zeigte sich, dass die Expression von wildtypischen Presenilin und mutanten Formen zu apoptotischen Ereignissen führt und somit mögliche Einblicke in neurodegenerative Prozesse bei Alzheimer liefert (Ye und Fortini, 1999).

## 1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung eines *Drosophila melanogaster* Modells für das Kufor-Rakeb Syndrom. Durch einen Sequenzvergleich wurde das Gen CG32000 als mögliches Ortholog zum humanen ATP13A2 identifiziert. Mit Hilfe von *knockdown*- und Überexpressionslinien sollen die Auswirkungen einer veränderten *dPark9*-Expression in der Fliege untersucht werden. Neben der Ermittlung der Lebenserwartung sollen auch die Auswirkungen auf das neuronale System analysiert werden. Dabei werden mittels Konfokalmikroskopie die dopaminergen Neuronen im Gehirn analysiert und ausgewertet. Zusätzlich sollen Verhaltensversuche durchgeführt werden um eventuelle motorischen Beeinträchtigungen zu detektieren.

Um Aussagen über die Funktion von dPark9 treffen zu können, soll dessen Lokalisation festgestellt werden. Dazu wird ein Fusionsprotein von dPark9 sowohl im Fettkörper von *Drosophila* als auch in Zellkultur exprimiert. Da es bisher mehrere Veröffentlichungen mit unterschiedlichen Ergebnissen in Bezug auf die Substratspezifität der ATPase gibt, soll durch Toxizitätsstudien die Klasse des Substrats bestimmt werden.

Neben den Experimenten zur Klärung der Substratspezifität soll der Einfluss von dPark9 auf die Beeinträchtigung der Proteinabbauwege, speziell im Fall der Akkumulation von  $\alpha$ -Synuclein, und die Auswirkung auf die lysosomale Enzymaktivität untersucht werden.

## 2 Material

### 2.1 Organismen

#### 2.1.1 Bakterienstämme und Zellkultur

Stamm	Eigenschaften	Referenz
<i>Escherichia coli</i> XL-1 blue	<i>recA1 endA1gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIqZ.M15 Tn10</i> (Tetr)]	Stratagene/Sambrook <i>et al.</i> , 1989
<i>Drosophila melanogaster</i> Schneider (S2) Zellen	Zelllinie 20-24h alter <i>D. melanogaster</i> Embryonen	Schneider, 1972

Tabelle 3: Verwendeter Bakterienstamm und Zellkulturlinie

#### 2.1.2 Fliegenstämme

##### 2.1.2.1 Verwendete Responderlinien

Stamm	Details	Herkunft	Referenz
<i>y<sup>1</sup> sc<sup>*</sup> v<sup>1</sup>; Disc/ RFP</i>	RNAi Linie <i>cherry</i> unter UAS - Kontrolle	Bloomington #35785	Transgenic RNAi Project, 2011
<i>UAS-dPark9 RNAi 1 (II)</i>	RNAi-Linie für CG32000	VDRC #105477	Dietzl <i>et al.</i> , 2007
<i>UAS-dPark9 RNAi 2/ TM3</i>	RNAi-Linie für CG32000	VDRC #29174	Dietzl <i>et al.</i> , 2007
<i>UAS-dPark9H-GFP 11.1</i>	Überexpression <i>dPark9H-GFP</i>	vorliegende Arbeit	
<i>UAS-dPark9H D5.4</i>	Überexpression <i>dPark9H</i>	Stammsammlung	Fiesel, 2013
<i>UAS-dPark9H D13</i>	Überexpression <i>dPark9H</i>	Stammsammlung	Fiesel, 2013
<i>UAS-dPark9H D22.1</i>	Überexpression <i>dPark9H</i>	Stammsammlung	Fiesel, 2013
<i>UAS-dPark9H D31.1</i>	Überexpression <i>dPark9H</i>	Stammsammlung	Fiesel, 2013
<i>UAS-GFP (III)</i>	UAS-Linie zur Expression von cytosolischem GFP	Stammsammlung	Gerlitz <i>et al.</i> , 2002
<i>UAS-lacZ (III)</i>	UAS-Linie zur Expression von <i>lacZ</i>	Stammsammlung	(Heberlein und Rubin, 1990)

Tabelle 4: Verwendete Responderlinien

## 2.1.2.2 Verwendete Treiberlinien

Stamm	Details	Herkunft	Referenz
<i>w[*]; Elav(x)-GAL4</i>	Treiberlinie; starke Expression in allen Neuronen	Bloomington #458	Lin und Goodman, 1994
<i>w[*]; Elav(III)-GAL4</i>	Treiberlinie; mittlere Expression in allen Neuronen	Bloomington #8760	Robinow und White, 1988
<i>w[*]; TH-GAL4</i>	GAL4 durch Tyrosinhydroxylase-promotor getrieben	Bloomington #8848	Friggi-Grelín <i>et al.</i> , 2003
<i>y[* ] w[*]; actin-GAL4/TM6B</i>	Treiberlinie zur ubiquitären Expression	Bloomington #3954	Ito <i>et al.</i> , 1997
<i>w[* ]; daughterless-GAL4</i>	Treiberlinie zur ubiquitären Expression	Bloomington #5460	Smith und Cronmiller, 2001
<i>w[* ]; GMR-GAL4</i>	Treiberlinie; Expression in Ommatidien	Stammsammlung	Freeman, 1996
<i>LSP-GAL4 (III)</i>	Treiberlinie zur Expression im Fettkörper	Bloomington #6357	Hassan, 2001
<i>nsyb-GAL(III)</i>	Treiberlinie zur Expression in allen Neuronen	Björn Brembs	Bushey <i>et al.</i> , 2009
<i>Mef2-GAL4, UAS-GFP GMA</i>	Treiberlinie zur Expression in Muskeln, Moesin mit GFP markiert	Frank Schnorrer	Dutta <i>et al.</i> , 2002
<i>UAS-Stinger/CyO; TH-GAL4/TM3</i>	Expression von nuklearem GFP in dopaminergen Neuronen	Stammsammlung	Botella <i>et al.</i> , 2008
<i>UAS-dPark9 RNAi 1/ CyO; TH-GAL4/ TM6B Gal80</i>	<i>knockdown</i> von <i>dPark9</i> in dopaminergen Neuronen	Stammsammlung	-
<i>myr-GFP; PDF-Gal4/Cyo</i>	Expression von myristoylierendem GFP in PDF-Neuronen	Stammsammlung	-

Tabelle 5: Verwendete Treiberlinien

### 2.1.2.3 Wildtypstamm, Mutanten und weitere Stämme

Stamm	Details	Herkunft	Referenz
Canton S (CS)	Wildtypstamm <i>Canton Special</i>	Stammsammlung	Lindsley und Grell, 1968
$w^{1118}$	white-Mutante	Stammsammlung	Lindsley und Grell, 1968
$y, w; K; \Delta 2-3 (III)$	yellow-white Fliegen mit P-Transposase	Stammsammlung	Lindsley und Zimm, 1992
$w^{[1]}$ ; $CyO/ScO$ ; $TM3/D^3$	Doppelbalancer	Stammsammlung	Lindsley und Zimm, 1992

Tabelle 6: Verwendeter Wildtypstamm, Mutanten und weitere Stämme

Die Fliegen werden in Gläsern mit Medium (Maismehl, Melasse, Agar, Sojamehl, Hefe und 3 g/7 Nipagin) bei 25°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 65% gehalten. Die Beleuchtung erfolgte im 12/12 h LD Tag/Nacht Rhythmus.

## 2.2 Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung/ Bezugsquelle
Eiablageplatten	250 ml/l Apfelsaft; 2 g/l Bacto Agar; 25 g/l Saccharose; 4 g/l Nipagin gelöst in 20 ml EtOH
LB <sub>0</sub> -Medium	10 g/l acto Tryptone; 10 g/l NaCl; 5 g/l Bacto Yeast Extract; 3 ml/l 1 M NaOH; pH 7
LB <sub>Amp</sub> -Platten	LB <sub>Amp</sub> -Medium (100 µg/ml Ampicillin) mit 8 g/l Bacto Agar
LB <sub>Amp</sub> -Medium	LB <sub>0</sub> -Medium mit Ampicillin (50-100 µg/ml)
Schneider's Drosophila Medium (SDM)	PAN Biotech

Tabelle 7: Verwendete Medien

## 2.3 Vektoren

Bezeichnung	Größe	Eigenschaften/ Verwendung	Resistenz	Herkunft
pUAST	9,0kb	Keimbahntransformation, <i>white</i> als Selektionsmarker	Ampicillin	Brand und Perrimon, 1993
pGEM-Teasy	3,0kb	TA-Klonierung von PCR-Produkten	Ampicillin	Promega
pCaSpeR	7,5kb	<i>actin-GAL4</i> Vektor für Zellkultur	Ampicillin	Thummel und Pirrotta, 1992

Tabelle 8: Verwendete Vektoren



## 2.4 Oligonukleotide

Bezeichnung	5'- 3'	Annealing - temperatur	Verwendung
Park9/1 forward (XhoI)	CTC GAG CAA AAT GTT CGC AAG TCA G	58°C	Amplifizierung von <i>dPark9H</i>
rev park9 (KpnI) oS	GGT ACC ACA AAA TCC CGG AAA C	54,4°C	Amplifizierung von <i>dPark9H</i>
Park9 Mid rev (KpnI)	GGT ACC GTC ATT GCC GCT GG	57,9°C	Amplifizierung von <i>dPark9H</i>
Park9 Mid fw neu	CCC CCT GTG GAC TAC AAG TTT G	56,7°C	Amplifizierung von <i>dPark9H</i>
G-Park9 Fw (XhoI) m. Kozak	CTC GAG CAA AAT GCA TTA TGT AGC G	56°C	Amplifizierung von <i>dPark9G</i>
PARK9 seq1 fw	GGT CTG TTG CGC CTC GTG	54,9°C	Sequenzierprimer <i>dPark9H</i>
PARK9 seq2 fw	GGA CTG TCT AAA GAG CTT CCA AC	55,3°C	Sequenzierprimer <i>dPark9H</i>
PARK9 seq3 fw	CTC GGG CAT ATC TGT TTA AAT CAT G	54,4°C	Sequenzierprimer <i>dPark9H</i>
PARK9 seq4 fw	GCA GTA TCT ATA TGT CGA TCT TGG AC	56,4°C	Sequenzierprimer <i>dPark9H</i>
forw GFP (KpnI)	GGT ACC ATG AGT AAA GGA GAA G	53°C	Amplifizierung <i>GFP</i>
GFP rev (XbaI) neu	TCT AGA TTA TTT GTA TAG TTC ATC CAT G	52,6°C	Amplifizierung <i>GFP</i>
PARK9 RT fw	TGA AAT ATT TTG CAT ATC TCC TAG GTC	55°C	rt-PCR; <i>dPark9</i> - Transkripte
PARK9 RT rev 1	CCA TCT TCC GTA AGA GTA CCA GTG	55°C	rt-PCR; <i>dPark9</i> - Transkripte A, B, H, G
rp49 fw	CCA AGC ACT TCA TCC GCC ACC	55°C	rt-PCR, <i>housekeeper</i>
rp49 rev	GCG GGT GCG CTT GTT CGA TCC	55°C	rt-PCR, <i>housekeeper</i>
AS2	CAA CTA CTG AAA TCT GCC AAG	55°C	Sequenzierprimer pUAST
S2	CAT TCC ACC ACT GCT CCC	55°C	Sequenzierprimer pUAST
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG G	55°C	Sequenzierprimer pGEM- Teasy
SP6	ATT TAG GTG ACA CTA TAG	55°C	Sequenzierprimer pGEM- Teasy

Tabelle 9: Verwendete Oligonukleotide

## 2.5 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

Antikörper	Verwendung	Verdünnung	Herkunft
anti-TH (rabbit)	primärer Antikörper gegen Tyrosinhydroxylase	1:100	Merck Millipore
anti- $\alpha$ -synuclein (mouse)	primärer Antikörper gegen $\alpha$ -Synuclein	1:1000	Zymed Labs
anti-PDF (mouse)	primärer Antikörper gegen PDF-Neuronen	1:100	Dr. Alois Hofbauer
rabbit anti-actin	primärer Antikörper gegen Aktin, <i>housekeeper</i>	1:2000	Sigma-Aldrich
goat anti-rabbit IgG 566 Cy3	fluoreszenter sekundärer Antikörper	1:80	Jackson ImmunoResearch (dianova)
goat anti-mouse 680	fluoreszenter sekundärer Antikörper	1:10000	Li-Cor
goat anti-rabbit 800	fluoreszenter sekundärer Antikörper	1:10000	Li-Cor
goat anti-mouse Alexa Fluor 488	fluoreszenter sekundärer Antikörper	1:80	Invitrogen
Alexa Fluor 568 Phalloidin	Muskelfärbung	1:500	Life Technologies
Lysotracker Red DND-99	Färbung saurer Organelle	100 nM	Life Technologies

Tabelle 10: Verwendete Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

## 2.6 Kitsysteme

Bezeichnung	Verwendung	Herkunft
pGEM-Teasy Vector System I	TA-Klonierung von PCR - Produkten	Promega
FuGENE HD Transfection Kit	Transfektion von S2-Zellen	Roche
MEGAscript Kit	Herstellung von dsRNA	Ambion
peqGOLD Trifast	RNA-Extraktion	Qiagen
Reverse Transcription Kit	Reverse Transkription	Qiagen
SYBR Green Kit	RT-PCR	BioRad
QIA quick Gel Extraction Kit	DNA-Isolierung aus Agarosegelen	Omega bio - tek
Cathepsin D Assay Kit	Messung der Cathepsin D Aktivität	Sigma-Aldrich
QIAprep spin Miniprep Kit	Plasmidisolierung	Qiagen

Tabelle 11: Verwendete Kitsysteme

## 2.7 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung	Verwendung
Acetat-Lösung	5 M Eissessig zu 5 M Kaliumacetat bis pH 4,8	Plasmid-Minipräparation
Alkali-SDS-Lösung	200 mM NaOH; 1% SDS (v/v)	Plasmid-Minipräparation
APS	10% APS	Western Blot
Bradford Coomassie Plus Protein Assay Reagent	Thermo SCIENTIFIC	Bestimmung der Proteinkonzentration
Elektrophoresepuffer (5x)	15 g Tris; 75 g Glycin; 25 ml 20% SDS; ad 1 l H <sub>2</sub> O	Western Blot
Gel-Ladepuffer, 6-fach	0,001 M EDTA; 50% Glycerin (v/v); 0,25% Bromphenolblau (w/v); 0,25% Xylencyanol (w/v)	Agarosegelelektrophorese
GTE-Puffer	50 mM Glukose; 25 mM Tris/HCl pH 8,0; 10 mM EDTA pH 8,0	Plasmid-Minipräparation
Injektionspuffer	5 mM KCl; 0,1 mM NaPO <sub>4</sub> pH 6,8	Keimbahntransformation
Lämmli-Puffer, 1-fach	195 mM Tris/HCl pH 6,8; 6% SDS; 30% Glycerin; 0,75% Bromphenolblau; 105 µl/ml β-Mercaptoethanol	Western Blot
LSB ( <i>low salt buffer</i> ), 10-fach	200 mM Tris/HCl pH 8,75; 100 mM KCl; 100 mM (NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub> ; 20 mM MgSO <sub>4</sub> ; 1 mg/ml BSA	PCR-Reaktion
Lysosomenextraktionspuffer (LEP)	100 mM Tris-HCl; 0,3 M Sucrose; 1 mM EDTA pH 7,5	Cathepsin D-Messung
Manganchlorid	7 mM Manganchlorid in 10% Saccharoselösung	Lebensdauerexperiment
Norspermidin	40 mM Norspermidin in 10% Saccharoselösung	Lebensdauerexperiment
<i>Odyssey Blocking Buffer</i> (OBB)	Li-Cor Bioscience	Western Blot
Paraformaldehyd	8% Paraformaldehyd in PBS	Fixierung von Gewebe
PBS ( <i>phosphate buffered saline</i> )	3 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 7 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 130 mM NaCl; pH 7,2	Präparation von Gewebe
PBST (0,1%, 0,3% oder 0,5%)	PBS mit Triton X-100 (v/v; 0,1%, 0,3% oder 0,5%)	Waschen von Gewebe
Polylysin	0,1 mg/ml in H <sub>2</sub> O, sterilfiltriert	Immunocytochemie
<i>Protein Cracking Buffer</i> (PCB)	0,01 M NaPO <sub>4</sub> pH 7,2 1% β – Mercaptoethanol (v/v) 1% SDS (w/v) 6 M Harnstoff 0,01% Bromphenolblau (w/v)	Proteinextraktion

Bezeichnung	Zusammensetzung	Verwendung
Rotiphoese-Gel 40	40% Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung, Verhältnis 29:1	Western Blot
TAE-Puffer, 50-fach	242 g Tris-Base; 57,1 ml Essigsäure; 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0; auf 1 l H <sub>2</sub> O	Agarosegelelektrophorese (1-fach)
Transferpuffer	10 ml 20% SDS; 200 ml MeOH; 3 g Tris; 15 g Glycin; ad 1 l H <sub>2</sub> O	Western Blot
Tris-HCl-Puffer	1,5 M Tris-HCl pH 8,8	Western Blot
Zinkchlorid	2 mM Zinkchlorid in 10% Saccharoselösung	Lebensdauerexperiment

Tabelle 12: Verwendete Puffer und Lösungen

## 2.8 Größenstandards und Enzyme

Enzyme/ Standards	Verwendung	Herkunft
Expand High Fidelity	Polymerase mit <i>proof-reading</i>	Roche
Restriktionsenzyme	Plasmidverdau	New England Biolabs
RNAse (10 µg/ml)	Mini-Präparation	Roth
T4 DNA Ligase	Ligation	Fermentas, New England Biolabs
Taq DNA Polymerase	Polymerase für Test- und Kolonie-PCR-Reaktionen	vom Lehrstuhl selbst hergestellt
100 bp und 1 kb DNA-Leiter	Größenstandards für Agarosegelelektrophorese	New England Biolabs
Color Plus Prestained Protein Marker	Größenstandard für Western Blot	New England Biolabs

Tabelle 13: Verwendete Größenstandards und Enzyme

## 2.9 Software

Programm	Hersteller	Verwendung
Alpha Manager	Alpha Innotech	Geldokumentation
BioEdit	Ibis Biosciences	Sequenzanalyse
CFX Manager software	Bio-Rad	Steuerungssoftware des Bio-Rad MiniOpticon Systems
DNASTAR	DNASTAR	Analyse Restriktionsstellen
Graph Pad Prism 5	Graph Pad	Statistik, Erstellung Graphen
Graph Pad Prism 6 Demo	Graph Pad	Statistik, Erstellung Graphen
Image J	NCBI	Bearbeitung von Bildern
Image Studio Light	Li-Cor	Bearbeitung von Bildern des Odyssey Scanners

LSM 510 Zeiss	LSM 510 Zeiss	Kontrolle des Zeiss 510 Konfokals
LSM Image Browser	Zeiss	Export der Konfokaldaten
Magellan	TECAN	Kontrollsoftware des TECAN infinite M200 PRO Plattenreaders
Odyssey	Li-Cor	Western Blot
pDRAW32	Aacalone	Erstellung von Vektorkarten

**Tabelle 14: Übersicht über die verwendete Software.**

## 2.10 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Ambion, BioRad, Biometra, Eppendorf, Hartenstein, Heraeus, Invitrogen, Li-cor, Merck, New England Biolabs Gilson, Omega bio-tek, Promega, Qiagen, Roche, Roth, Sigma-Aldrich, TECAN, VWR, Whatman, Zeiss.

## 3 Methoden

### 3.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.1.1 Plasmid-Minipräparation

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte aus einer 2 ml LB<sub>Amp</sub>-Übernachtskultur nach dem Protokoll von Sambrook *et al.* (1989). Das Pellet wurde in 50 µl H<sub>2</sub>O gelöst.

Für die Herstellung von DNA mit hohem Reinheitsgrad wurde der QIAprep spin Miniprep Kit verwendet. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll im Benutzerhandbuch. Die Elution fand mit 30 µl H<sub>2</sub>O statt.

#### 3.1.2 DNA-Spaltung durch Restriktionsenzyme

Der enzymatische Verdau von DNA erfolgte in einem Reaktionsvolumen von 20 µl. Die Versuchsbedingungen wurden den Angaben des Herstellers (New England Biolabs) entnommen.

#### 3.1.4 Agarosegelelektrophorese/Gelextraktion

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte durch 0,8-1%igen Agarosegele, denen Ethidiumbromid (0,1 mg/ml, Roth) beigefügt wurden. Die Proben wurden mit Gelladepuffer versetzt und bei 110 Volt in 1-fach TAE aufgetrennt.

Für die Isolierung der DNA-Fragmente wurden diese unter UV-Licht ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die DNA wurde mit 30 µl EB eluiert.

#### 3.1.5 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte über Nacht bei 18°C in einem Reaktionsvolumen von 10 µl laut Herstellerangabe. Das Verhältnis Vektor zu Insert betrug 1:1, 1:3 und 1:5. Die *blunt-end* Ligation von PCR-Produkte in den Vektor pGEM-Teasy (Promega), erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

#### 3.1.6 Hitzeschocktransformation von *E. coli*

Die Transformation *heat-shock* kompetenter *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA erfolgte nach dem Protokoll von Ausubel *et al.* (1996).

### 3.1.7 Polymerase-Kettenreaktion

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde folgendes Protokoll verwendet:

#### Ansatz

template ca. 100ng	x µl
Primer fw 10 µM	1 µl
Primer rev 10 µM	1 µl
dNTPs 40 mM	1 µl
10-fach LSB	2,5 µl
Tag	1 µl
H <sub>2</sub> O	ad 25 µl

#### Programm

Denaturierung	95°C	3 min	1 x
Denaturierung	95°C	30 sec	} 30 x
Annealing	x°C	30 sec	
Elongation	72°C	y min	
Elongation	72°C	10 min	1 x

x abhängig von GC-Gehalt und Länge der Primer;  
y abhängig von der Länge des zu amplifizierenden Produkts

### 3.1.8 RNA-Isolierung

Die RNA-Extraktion wurde mit peqGOLD TriFast (Pepqlab) laut Anweisung durchgeführt. Pro Extraktion wurden  $1 \cdot 10^6$  –  $9 \cdot 10^6$  Zellen, 10-15 L3-Larven oder adulte Fliegen in 1 ml Trifast homogenisiert und laut Herstellerprotokoll weiter verarbeitet.

### 3.1.9 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA und RNA erfolgte mit dem Nanodrop ND-1000 der Firma Pepqlab.

### 3.1.10 Reverse Transkription

Für die Herstellung von cDNA aus Total-RNA wurde der Reverse Transcription Kit der Firma Qiagen verwendet. Der Ansatz laut Herstellerprotokoll wurde halbiert und 500 ng RNA pro Reaktion eingesetzt. Anstatt der beiliegenden *random*-Primer wurden Oligo-dT-Primer verwendet, die speziell an die Poly-A-Sequenz der RNA binden.

### 3.1.11 Semi-quantitative *Real-time*-PCR

Für die *Real-time*-PCR wurde das System der Firma Biorad verwendet. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green wird in doppelsträngige DNA eingebaut und das zunehmende Signal am Ende jeder Elongation gemessen. Die Anregung erfolgt bei 494 nm und die Emission bei 512 nm. Als interner Standard wurde das *housekeeping* Gen *rp49* verwendet.

Der Ansatz und das Programm sahen wie folgt aus:

### Ansatz

template cDNA	0,5 µl
Primer forward 10 µM	0,5 µl
Primer reverse 10 µM	0,5 µl
SYBR Green	5 µl
H <sub>2</sub> O	ad 10 µl

### Programm

Aktivierung	95°C	3 min	1 x
Denaturierung	95°C	15 sec	} 40 x
Annealing	55°C	30 sec	
Elongation	72°C	20 sec	

## 3.2 SDS-Page und Western Blot

### 3.2.1 Proteinextraktion

Die Köpfe von 30-40 N<sub>2</sub> gefrorenen Fliegen wurden abgetrennt, in 60 µl *Protein Cracking Buffer* homogenisiert und 5 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dann in ein neues Cup überführt.

### 3.2.2 SDS-Page

15 µl des Proteinextrakts wurde 5 min bei 95°C aufgekocht. Die Probe wurde dann in die Taschen geladen und das Gel 1½ h bei 110 V laufen gelassen.

	5% Sammelgel	12% Trenngel
40% Acrylamid	375 µl	1,8 ml
1,5 M Tris/HCl pH8,8	375 µl	1,35 ml
H <sub>2</sub> O	2,22 ml	2,64 ml
20% SDS (w/v)	15 µl	30 µl
10% APS (w/v)	25 µl	30 µl
TEMED	5 µl	3 µl

### 3.2.3 Semi-dry Western Blot

Um die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran zu transferieren wurde die *semi-dry* Methode verwendet. Dafür wurde die Membran mit H<sub>2</sub>O benetzt und jeweils 2 x drei Whatmanpaper in Transferpuffer getaucht. Der Aufbau des Blot war wie folgt:



Abbildung 9: Aufbau des Blots



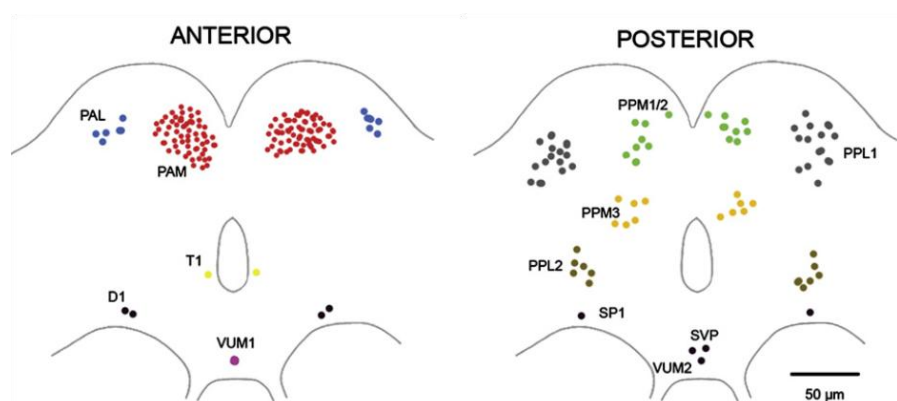
Der Blot wurde 1 h bei 400 mA laufen gelassen. Danach wurde die Membran 5 min in TBS gewaschen und im Anschluss 2 h in OBB/TBS (1:1) unter Schütteln geblockt. Die Inkubation des ersten Antikörpers anti- $\alpha$ -synuclein (1:1000) und anti-actin (1:2000) erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach zweimaligem Waschen (15 min) mit TBST wurde die Membran für 2 h mit den sekundären Antikörpern anti-mouse 680 und anti-rabbit 800 (1:10 000) in OBB/TBST (1:2) bei RT inkubiert. Nach einem 2 x 15 minütigen Waschschritten mit TBST konnte die Membran in TBS gelagert und mit dem Odyssey Infrared Imaging System Scanner gescannt werden.

### 3.3 Histologie

#### 3.3.1 Whole mount Präparation von Fliegengehirnen

Fliegen wurden 2 h bei Raumtemperatur in 4% PFA/ 0,5% Triton X-100 unter Schütteln fixiert. Danach wurden die Gehirne in PBS freipräpariert und 5x 15 min mit 0,1% PBST gewaschen. Im Anschluss wurde mit 10% NGS in 0,5% PBST 2h geblockt und mit dem primären Antikörper (siehe Tabelle 10) 72 h bei 4°C inkubiert. Der Antikörper wurde entsprechend mit 10% NGS in 0,5% PBST verdünnt. Nach der Inkubation wurden die Gehirne ca. 1 h bei RT aufgewärmt und 5x 15 min mit 0,1% PBST gewaschen. Der sekundäre Antikörper (siehe Tabelle 10) wurde ebenfalls in 10% NGS in 0,5% PBST verdünnt. Die Inkubation erfolgte 24 h im Dunkeln bei 4°C. Nach abschließenden 5x 15 min Waschschritten mit 0,1% PBST wurden die Gehirne auf vorbereiteten Objektträgern in *Vecta shield* eingebettet.

Für die Quantifizierung der dopaminergen Neuronen wurde teilweise kernlokalisiertes GFP exprimiert (stinger GFP) und nur die Neuronen gezählt, die sowohl eine Anti-Th-Färbung (rot) als auch ein GFP-Signal (grün) aufweisen. Für die Analysen wurden die Cluster PAL, PPL1 und PM1/2 ausgewertet (Abbildung 10).



**Abbildung 10: Übersicht über das dopaminerge System im Gehirn von *D. melanogaster*.** Die dopaminergen Neuronen sind spiegelgleich in Gruppen angeordnet und bestehen aus einer spezifischen Anzahl von Neuronen (Botella *et al.*, 2008 nach Nässel und Elekes, 1992).

### 3.3.2 *Whole mount* Präparation der indirekten Flugmuskulatur

Die Fliegen wurden mit CO<sub>2</sub> betäubt und Kopf, Flügel und Abdomen entfernt. Die Fixierung der Thoraxe fand für 30 min in 4% PFA / 0,3% PBST statt mit anschließenden 2x 5 minütigen Waschschritten mit 0,3% PBST. Die Thoraxe wurden sagittal mit einer Präparierschere durchschnitten. Die Muskelfärbung erfolgte über Nacht bei 4°C im Dunkeln mit Phalloidin (1:500) in 0,3% PBST. Am nächsten Tag wurde 2x 15 min mit 0,3% PBST gewaschen und auf vorbereitete Objektträger in *Vecta shield* eingebettet.

### 3.3.3 Lysotracker Färbung im larvalen Fettkörper

L3-Larven wurden für 3 h auf H<sub>2</sub>O getränktes Filterpapier gesetzt und auf Eis die Fettkörper in PBS freipräpariert. Deren Inkubation in 100 nM Lysotracker Red DND-99 (Life Technologies) erfolgte für 30 min im Dunkeln. Nach den Waschschritten (4x 5 min) konnten die Präparate anschließend in *Vecta shield* auf einem Objektträger eingebettet werden.

### 3.3.4 Lysotracker-Färbung von S2-Zellen

Die S2-Zellen wurden auf Polylysin-beschichteten Deckgläschen wachsen gelassen und 2x mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 30 min mit 100 nm Lysotracker in PBS inkubiert und in *Vecta shield* eingebettet.

### 3.3.5 Quantifizierung der GFP-Signalintensität in dopaminergen Neuronen

Für die Quantifizierung der GFP-Signalstärke wurden Gehirne 2h in 4% PFA/0,5% PBST fixiert, in PBS freipräpariert und in *Vecta Shield* eingebettet. Die Gehirne wurden alle in derselben Orientierung (posterior) mit dem Zeiss LSM und gleichbleibenden Einstellungen gescannt. Die Auswertung fand mit der ImageJ Software statt.

## 3.4 Keimbahntransformation

### 3.4.1 Mikroinjektion

Für die Injektion verwendete Fliegenembryonen stammen aus einer Kreuzung von  $w^{1118}$  mit Transposasefliegen  $yw$ ,  $Ki\Delta 2-3$  (siehe Tabelle 4).

30 min alte Embryonen wurden von Eiablageplatten gesammelt und durch Wenden auf einem Klebestreifen das Chorion entfernt. Die Embryonen wurden 7 min über Kieselgel getrocknet und dann mit Voltaleft-Öl überschichtet. Mit Hilfe eines Mikromanipulators wurde die Plasmid-DNA (300 ng/μl) in die Nähe der Polzellen injiziert. Die Embryonen wurden auf Apfelagarplatten inkubiert und die geschlüpften Larven in Standardmedium überführt.

### 3.4.2 Selektion der transformierten Fliegen und Balancierung der Stämme

Die Selektion auf transformierte Fliegen erfolgte durch eine Rückkreuzung zu  $w^{1118}$ . Transformanten zeigten in der folgenden F1-Generation orange bis rote Augen, die durch die Aufnahme des in pUAST enthaltenen mini-*white*-Gens verursacht werden.

Die Balancierung des P-Elements erfolgte durch die Kreuzung von transformierten Männchen zum Doppelbalancerstamm *yw*; *Cyo/Sco*; *D<sup>3</sup>/TM3*.

## 3.5 Biochemische Methoden

### 3.5.1 Cathepsin D-Messung

Die Aktivitätsmessung erfolgte mit dem Cathepsin D Assay Kit der Firma Sigma. Dabei wird ein intern gequenches fluoreszierendes Substrat verwendet. Das MCA-Gly-Lys-Pro-Ile-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Lys(DNP)-D-Arg-NH<sub>2</sub>-trifluoroacetat-Salz ist zu Beginn nicht fluoreszent, da die MCA-Gruppe die DNP-Gruppe quencht. Nach der Spaltung durch Cathepsin D zwischen den zwei Phenylalaninen kann das freiwerdende MCA-Peptid bei 328 nm angeregt werden.

Für die Cathepsin D-Messung wurden vier Fliegen in 200 µl Lysosomenextraktionspuffer (LEP) homogenisiert und zentrifugiert (5 min, 900 g, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und für die Messung eine 1:10 Verdünnung mit LEP hergestellt. Der Ansatz und die Messung erfolgten laut Angaben des Herstellers im Fluoreszenzspektrometer (Magellan).

Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford bestimmt. Dazu wurden 5 µl der unverdünnten Extraktion bei 595nm am Photometer (TECAN infinite M200 PRO) gemessen.

## 3.6 S2-Zellkultur

### 3.6.1 Kultivierung von S2-Zellen

S2-Zellen wuchsen in Suspension in Spinnerflaschen im 29°C-Inkubator. Das Kulturmedium bestand aus Schneider's Drosophila Medium (SDM) mit 10% hitzeinaktiviertes *fetal bovine serum* (FBS). Um eine Kontamination durch Bakterien vorzubeugen, wurde Penicillin G und Streptomycin hinzugegeben (50 Units bzw. 50 µg/ml). Die Zellen wurden gesplittet, wenn ihre Dichte zwischen 6 - 20 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml lag.

### 3.6.2 Transfektion

Für die Transfektion wurden 5 x 10<sup>5</sup> Zellen/ml in 12-well Platten ausgesät und über Nacht bei 29°C inkubiert. Der Transfektionsansatz orientierte sich an den Angaben des FuGENE HD Transfection Kits der Firma Roche.

## 3.7 Organismische Methoden

### 3.7.1 Alterung, Metall- und Polyaminversuche

Für Alterungsversuche unter Standardbedingungen wurden die Fliegen auf Gläsern mit Normalmedium ohne Hefe gehalten und alle 2-3 Tage in frische Gläser umgesetzt. Für die Ermittlung der Lebensdauer wurden 100 männliche Fliegen pro Genotyp auf vier Gläser aufgeteilt (25 Fliegen pro Glas).

Die Untersuchung der Lebensspanne unter diätischen Bedingungen bzw. auf unterschiedlichen Substraten erfolgte durch Inkubation der Fliegen auf Filterpapier. Im Glas befanden sich drei Filterpapiere, die mit 650 µl der entsprechenden Lösung getränkt waren. Jeden Tag wurde die Anzahl der gestorbenen Fliegen bestimmt und 100–120 µl Lösung zugegeben, um ein Austrocknen der Filterpapiere zu verhindern.

Die verwendeten Lösungen waren wie folgt:

10% Saccharose

10% Saccharose mit 2 mM Zinkchlorid

10% Saccharose mit 7 mM Manganchlorid

10% Saccharose mit 40 mM Norspermidin

## 3.8 Verhaltensversuche

### 3.8.1 Negative Geotaxis

Einen Tag vor dem Verhaltensversuch wurden 10-15 männliche Fliegen auf Eis betäubt und in Gläser ohne Hefe vereinzelt.

Die Fliegen wurden am nächsten Tag in 25 ml Plastikpipetten überführt und 2 min akklimatisiert. Für die Ermittlung der lokomotorischen Fähigkeiten wurde der höchste Punkt gemessen, den die Fliegen innerhalb von 12 sek in einer aufrecht stehenden Pipette erreichen konnten. Jeder Genotyp wurde dreimal getestet und die Kletterfähigkeit in cm/sek berechnet.

## 3.9 Statistische Auswertung

Die grafische Darstellung der Versuche erfolgte mit der GraphPad Prism 5 Software. Für die statistische Analyse der Lebenskurven wurde der Gehan-Breslow-Wilcoxon Test verwendet.

Die Auswertung der Kletterversuche und Neurodegeneration von dopaminergen Neuronen wurde mit Hilfe des *t*-tests und des *one-way*-Anova Tests durchgeführt.

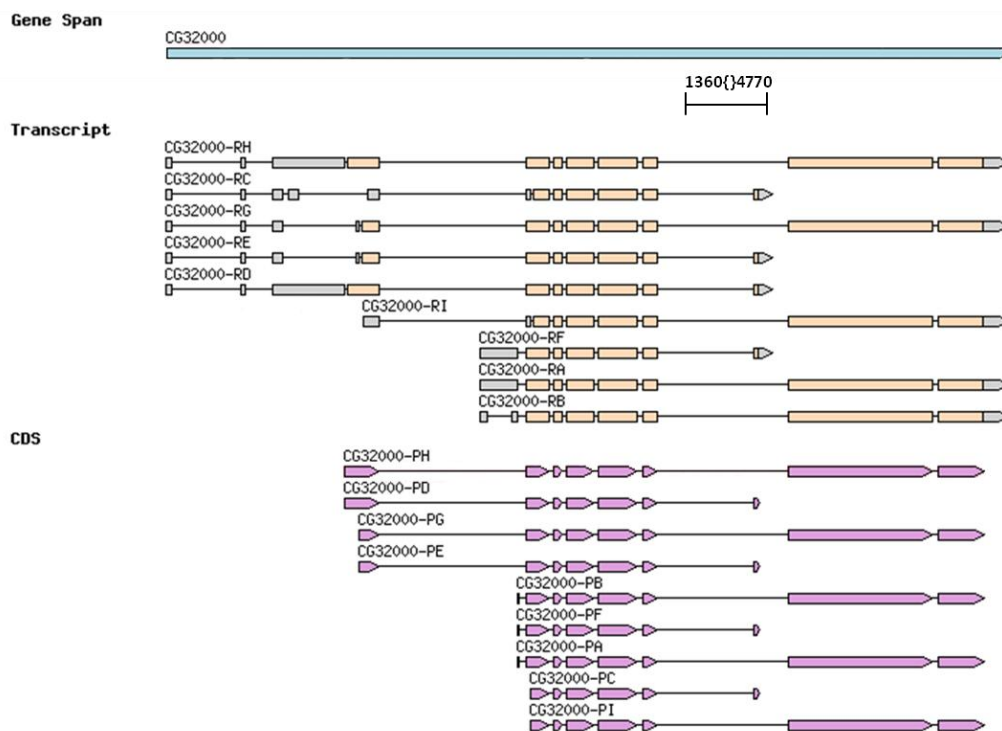
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Das *Drosophila* Ortholog zum humanen ATP13A2

#### 4.1.1 Isoformen und Struktur

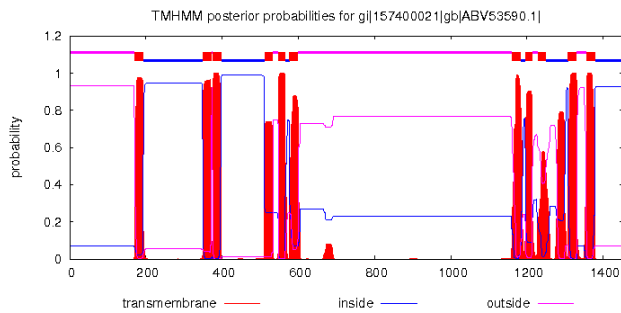
Ein Vergleich der humanen Proteinsequenz von ATP13A2 Isoform-1 (Accession number AAH30267.1) mit Hilfe des Programms BLAST ergab mit einer 37% Sequenzidentität das Gen CG32000 in *Drosophila melanogaster*.

CG32000 ist bisher wenig erforscht und an der zytologischen Position 102A3-102A4 auf dem vierten Chromosom lokalisiert. Das Gen codiert für neun Transkripte, von denen die vier kurzen (C, D, E und F) nur durch das Vorhandensein eines natürlichen Transposons entstehen. Die Insertion des Transposons 1360 führt zu einer neuen Spleißstelle und somit zu einem verkürzten C-Terminus (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Übersicht über das Gen CG32000, mit den verschiedenen Transkript- und Proteinisoformen.** Die fünf langen Formen (A, B, G, H und I) besitzen eine ATP-Bindedomäne im vorletzten Exon. Die kurzen Transkripte (C, D, E und F) entstehen durch ein natürlich vorkommendes Transposon (1360-4770). CDS: coding DNA sequence ([www.flybase.org](http://www.flybase.org)).

Die fünf langen Transkripte unterscheiden sich alle in ihrer 5' *untranslated region* (UTR) und codieren für vier verschiedene Proteine, wobei die codierende Sequenz von A und B identisch ist.



**Abbildung 12: Zweidimensionale Struktur von dPark9H.**

Die Analyse ergab elf Transmembrandomänen für das *Drosophila* Protein (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>).

Motiv der ATP-Phosphorylierungsstelle (Abbildung 13). Diese Sequenz liegt im sechsten Transmembranabschnitt und ist vermutlich an der Ausbildung der Ionen-Bindestelle beteiligt.  $P_5$ -ATPasen können auf Grund der Sequenz für die Ionenbindestelle in zwei weitere Gruppen unterteilt werden.  $P_{5A}$ -Transporter besitzen das Motiv PP(D/E)LPxE während  $P_{5B}$ -ATPasen die konservierte Sequenz PP(A/V)LPaX aufweisen. Auf Grund des Austauschs von zwei negativ geladenen Aminosäuren gegen zwei hydrophobe, wird ein starker Einfluss auf die Substratspezifität vermutet, so dass  $P_{5A}$ - und  $P_{5B}$ -ATPasen unterschiedliche Ionen transportieren (Møller *et al.*, 2008).

Die einzige  $P_{5B}$ -ATPase wie ATP13A2, die in *Drosophila* existiert, ist CG32000, so dass alle diese Ergebnisse die Annahme bestärken, dass dPark9 das Ortholog zum humanen PARK9 ist.

Eine Analyse der Proteinsequenz mit dem Programm TMHMM, das zur Voraussage von Transmembranhelices verwendet wird, ergibt elf Transmembrandomänen für das *Drosophila* Gen (Abbildung 12).

Das humane ATP13A2 und CG32000 verfügen beide neben einer Aktuatorbindestelle mit dem Sequenzmotiv TGES auch über eine Nukleotidbindestelle (KGSPE). Sie gehören zur Unterfamilie der  $P_5$ -ATPasen und besitzen wie alle Mitglieder das charakteristische DKTGTLT-

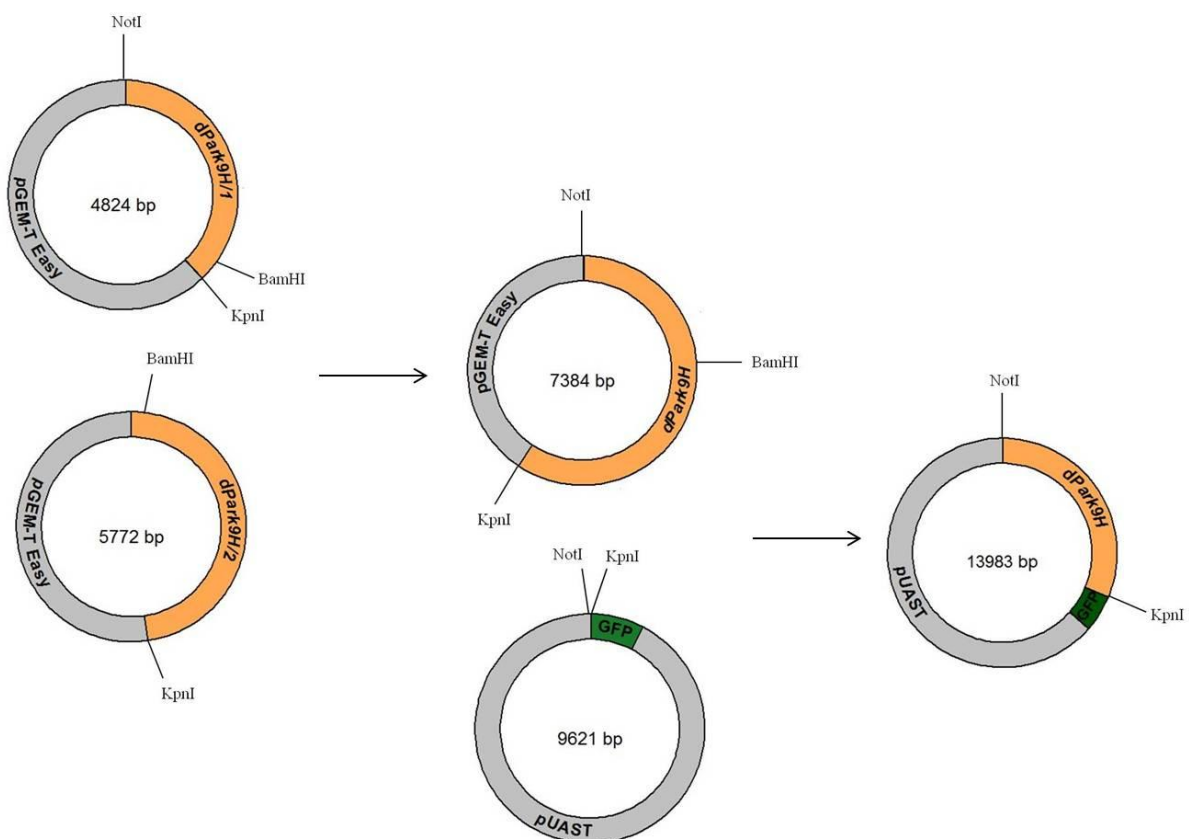
gi 157400021 gb ABV53590.1	445	TLHCDAILISGNCILDESMLTGESVPVTKTLPSPKRDIMFDKTEHARHTLFCGTVKIQTRYIGSKKVLAFVINTGNITAKGELIRSILYPPPVVDYKFEQD
gi 20988435 gb AAH30267.1	321	LMPCDAAVLAGECMVNESSLTGESIPVLKTALPEGLGPYCAET-HRRHTLFCGTLILQARAYVGPVLAHVTRTGCTAGKGLVSSILHPRPINFKPKYKH
gi 157400021 gb ABV53590.1	545	SYKFIQFLAIIACVGFYITLVTKILRGTDV-KIAVESLDLITIVVPPALPAAMTVGRFYAQRLKTSBIFCISPRINVAGSINCCCPDKTGTLTEDGL
gi 20988435 gb AAH30267.1	420	SMKFVAALSVLALLGTIYSIFI-LYRNRVPLNEIVIRALDLTVTVVPPALPAAMTVCTLYAQSLRRQGIFCIHPLRLNLGGKLQVCFDKTGTLTEDGL
gi 157400021 gb ABV53590.1	644	DMMGVVPKSSTNQFIPLK-SVDRLPFDHFLFGMTCHSITILNGRMMGDPLDLKMFESTGWELEDSNNIPDTEKYGILYPTILRQPRG--GLSGMAETE
gi 20988435 gb AAH30267.1	519	DVMGVVPLKG--QAPLPLVPEPRRLPVGPLLRLALATCHALSRLQDTPVGDPMCLKMVESTGWVLEEEPPA-D-SAPGTQVLAVMRPLWEPQLQAMEEP-
gi 157400021 gb ABV53590.1	741	SGSKNEIKRQSSVDDLLATVGISPSQKNFDHGIVREFPFTSALQRMVVTCLSDQVFNVCYKGSPEMLKKLCKPQSLPDNYSQQLSEPAKKGYYRIIAIA
gi 20988435 gb AAH30267.1	614	-----FVPVSVLHRFPFSSALQRMVVTAWPGATQPEAYVKGSPELVAGLCNPETVPTDFAQMLQSYTAAGYRVVALA

**Abbildung 13: Ausschnitt aus dem Alignment der charakteristischen Domänen von CG32000 und PARK9.** Aktuatorbindestelle (grün), Ionenbindestelle (rot), ATP-Phosphorylierungsstelle (blau), Nukleotidbindestelle (gelb). Das Alignment wurde mit dem Programm T-Coffee durchgeführt. CG32000 = ABV53590.1; PARK9 = AAH30267.1.

## 4.2 Herstellung von p[UAS-dPark9H-GFP] und p[UAS-dPark9G-GFP]

Zur Analyse der Lokalisation der Isoformen dPark9H und -G wurden die Konstrukte p[UAS-dPark9H-GFP] und p[UAS-dPark9G-GFP] für die Keimbahntransformation in *Drosophila* und Expression in S2-Zellen kloniert.

Auf Grund der Größe von 4356 bp von *dPark9H* wurde das Konstrukt in zwei Schritten amplifiziert. Mit den Primern 5'Park9/1 forward (XhoI) und 3'Park9 Mid rev (KpnI) wurde das Gen von Anfang bis Position 1794 und die zweite Hälfte mit den Primern 5'Park9 Mid fw neu und 3'rev Park9 (KpnI) oS von Position 1624 bis zum Ende der *white*-cDNA amplifiziert. Mit Hilfe des Primers 5'Park9/1 forward (XhoI) wurde die *Drosophila*-Kozak Sequenz angefügt um eine optimale Expression zu gewährleisten (Kozak, 1989). Beide Stücke wurden dann jeweils in den Zwischenvektor pGEM-T Easy kloniert (pGEM-T Easy-dPark9H/1 und 2). Das Gen konnte durch die interne Schnittstelle BamHI und die Primerschnittstelle KpnI in pGEM-T Easy zusammengefügt und in den Expressionsvektor pUAST-GFP kloniert werden (Abbildung 14).



**Abbildung 14: Klonierungsstrategie für pUAST-dPark9H-GFP.** *dPark9H* wurde in zwei Stücken amplifiziert und im Vektor pGEM-T Easy zusammengefügt. Das ganze Fragment wurde im Anschluss in den Vektor pUAST-GFP kloniert.

Die Isoform *dPark9G* ist am N-Terminus um 189 bp kürzer als die H-Form, ist aber in der restlichen Sequenz identisch. Somit konnte *dPark9G/1* mit einem neuen 5'Primers von *dPark9H* amplifiziert werden. Die weitere Strategie für die Herstellung von pUAST-*dPark9G-GFP* war die gleiche wie für pUAST-*dPark9H-GFP*. Die Richtigkeit der Konstrukte wurde durch Sequenzierung überprüft.

Das 13,9 kb große Konstrukt p[*UAS-dPark9H-GFP*] wurde in 270 Embryonen injiziert (s. 3.4.1) von denen 56% das Larvenstadium erreichten. Von diesen entwickelten sich 79% zu adulten Fliegen, woraus acht unabhängige stabile Linien etabliert wurden (s. Anhang 7.4.2).



### 4.3 Subzelluläre Lokalisation von dPark9

Eine wichtige Frage in Bezug auf die Funktion von dPark9 in *Drosophila* ist die Lokalisation des Proteins innerhalb der Zelle. Auf Grund von Untersuchungen des humanen ATP13A2 wird sie in Lysosomen vermutet (s. 1.3.2).

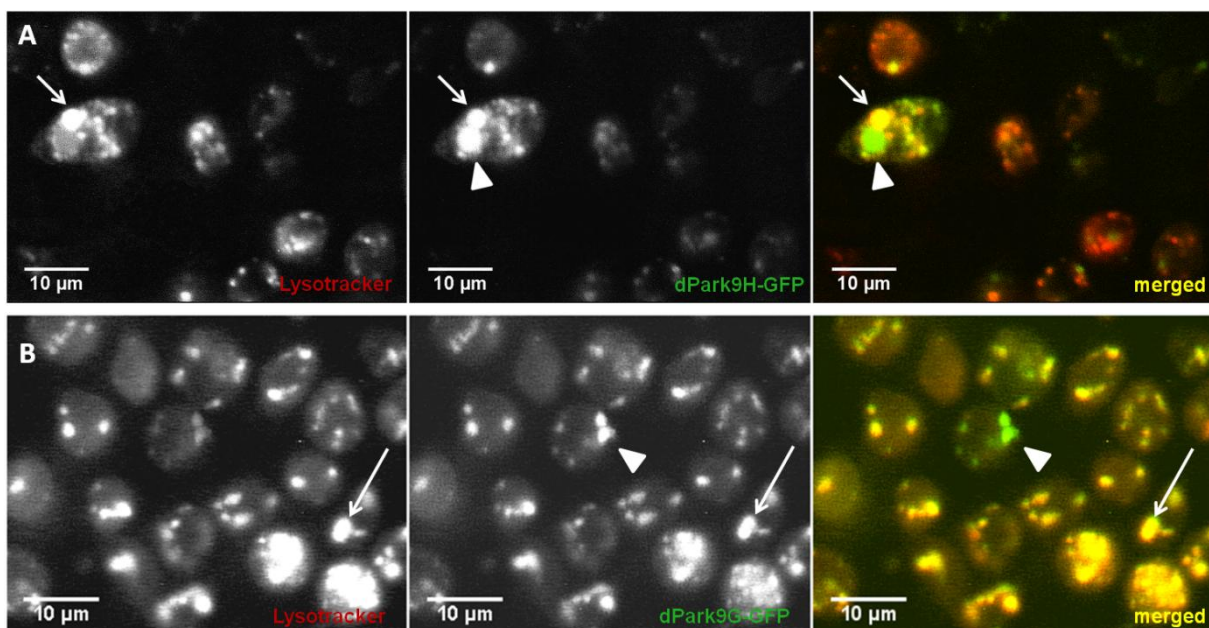
Hierfür wurden sowohl S2-Zellen als auch die Fettkörper von L3-Larven auf die Lokalisation von exogenem dPark9 untersucht.

#### 4.3.1 dPark9H- und dPark9G-GFP sind in den Lysosomen von S2-Zellen lokalisiert

Die Expression der beiden GFP-getaggten dPark9-Isoformen H und G in pUAST erfolgte mittels des *UAS-GAL4*-Systems mit Hilfe des *actin-GAL4*-Vektors pCasper. S2-Zellen wurden mit beiden Vektoren kotransfiziert, inkubiert (s. 3.6.) und anschließend mit dem Marker Lysotracker Red DND-99 gefärbt.

Der Lysotracker markiert als selektiver pH-Indikator alle Organelle, die einen sauren pH-Wert besitzen (späte Endosomen und Lysosomen). In S2-Zellen kann eine Übereinstimmung in der Lokalisation der Fusionsproteine dPark9H-GFP mit dem Lysotracker-Signal beobachtet werden. Bei Vesikeln, die keine Übereinstimmung mit dem Marker aufweisen, handelt es sich möglicherweise um frühe Endosomen, da diese einen höheren pH-Wert besitzen (Abbildung 15A).

Die Isoform dPark9G-GFP kann ebenfalls in den Lysosomen und späten Endosomen detektiert werden. Wie auch die Isoform H gibt es Vesikel, die nur ein GFP-Signal, aber keine Lysotrackerfärbung zeigen (Abbildung 15B).



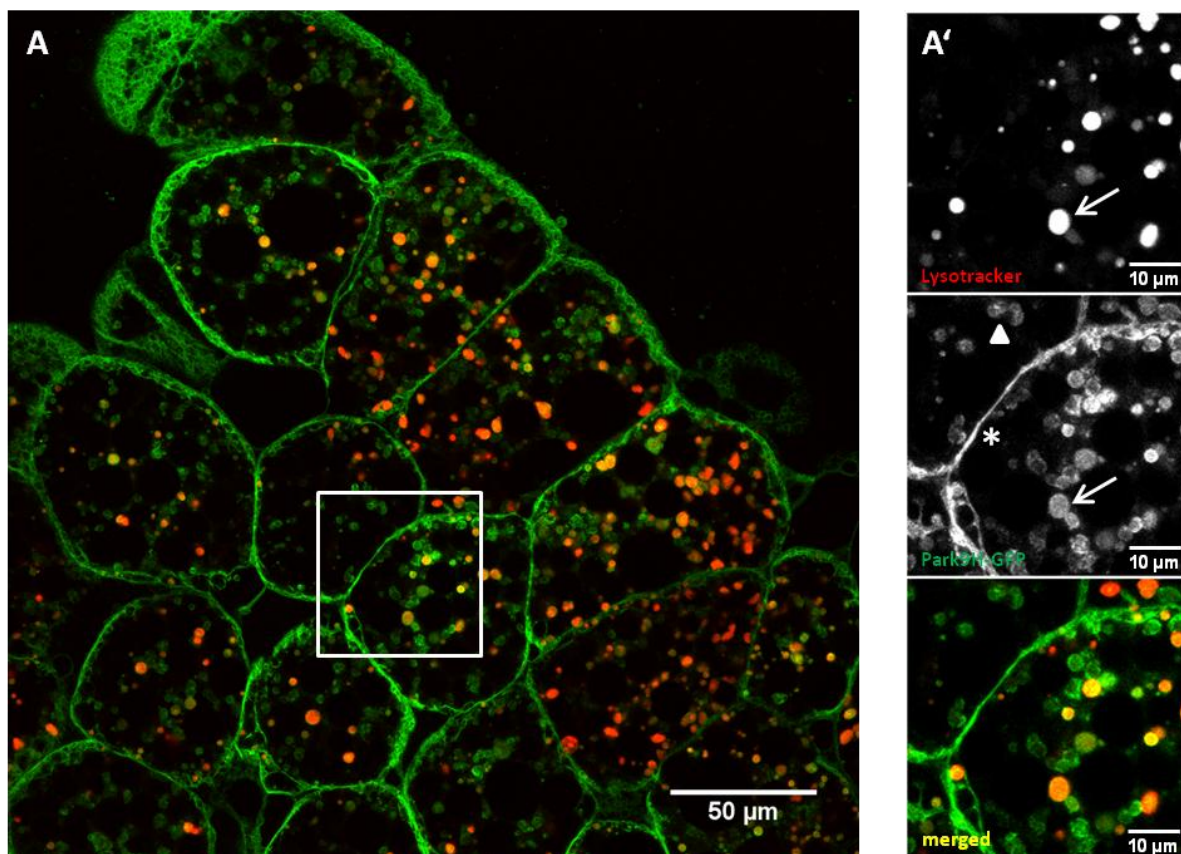
**Abbildung 15: Lokalisation von dPark9H- und dPark9H-GFP in S2-Zellen.** Es ist eine Kolokalisation von dPark9H-GFP (A) und dPark9G-GFP (B) mit der Lysotrackerfärbung zu beobachten (Pfeile). Einige wenige Vesikel zeigen keine Überlappung mit dem Marker (Dreiecke).

Beide Isoformen dPark9H und -G können in den Lysosomen, späten Endosomen und Vesikeln mit einem basischen pH-Wert von S2-Zellen detektiert werden. Der Unterschied in der Aminosäuresequenz im N-Terminus der G-Form enthält demnach kein Peptidsignal für eine unterschiedliche Lokalisation.

#### 4.3.2 Lokalisation von dPark9H-GFP in Lysosomen, Endosomen und der Membran im larvalen Fettkörper

Um zu überprüfen, wie sich das Fusionsprotein dPark9H-GFP *in vivo* verhält, wurde das Gen in *Drosophila* exprimiert. Die Kreuzung der Überexpressionslinie *UAS-dPark9H-GFP* 11.1 mit dem Treiber *LSP-GAL4* führt zu einer Expression in den Fettkörpern. Diese wurden aus L3-Larven freipräpariert (s. 3.3.3) und die unfixierten Präparate zeitnah mit dem Konfokalmikroskop analysiert.

Das Fusionsprotein dPark9H-GFP ist wie in den S2-Zellen in den Lysosomen und späten Endosomen lokalisiert. Viele Vesikel zeigen ebenfalls keine Doppelfärbung mit dem Lysotracker, was auf einen basischeren pH-Wert schließen lässt. Im Unterschied zu den Zellkulturergebnissen kann das Protein zusätzlich noch in der Zellmembran der Fettkörperzellen detektiert werden (Abbildung 16).



**Abbildung 16: Lokalisation von dPark9H-GFP im larvalen Fettkörper.** Übersicht über den Fettkörper von L3-Larven des Genotyp *LSP-GAL4/UAS-dPark9H-GFP* 11.1. (A). Ein vergrößerter Ausschnitt (A') zeigt eine Co-Lokalisation von dPark9H-GFP und dem Lysotracker in den Lysosomen (Pfeile). Das Fusionskonstrukt kann des Weiteren in der Membran (\*) und nicht-sauren Vesikeln (Dreieck) detektiert werden.

## 4.4 Phänotypenanalyse

### 4.4.1 Charakterisierung der *dPark9-knockdown-* und *dPark9H-Überexpressionslinien*

Auf Grund der Lokalisation von *dPark9* auf dem vierten Chromosom stehen bis zum jetzigen Zeitpunkt keine mutanten *dPark9*-Fliegen zur Verfügung. Deshalb wurden die beiden Linien *UAS-dPark9-RNAi 1* (RNAi 1) und *UAS-dPark9-RNAi 2* (RNAi 2) vom *Vienna Drosophila Resource Center* (VDRC) für die Analyse verwendet (s. 2.1.2.1). Der Wirtstamm für die RNAi-Linien verfügt über zwei *landing sites* für den pKC26 RNAi *hairpin* Vector, so dass manche Linien zwei Insertionen besitzen wie z.B. die RNAi 1 Linie (Green *et al.*, 2014).

In beiden Linien findet die RNA-Interferenz gegen dasselbe Exon statt, welches in allen neun Transkripten vorkommt: In Linie RNAi 1 von der Position 137890 bis 138179 (290bp) und in Linie RNAi 2 von Position 137838 bis 138088 (251bp) (siehe Anhang Abbildung 61).

Die beiden RNAi-Linien wurden auf 25°C zu verschiedenen Treibern gekreuzt. Dabei zeigt sich, dass *UAS-dPark9 RNAi 1* mit dem ubiquitären Treiber *actin-GAL4* sowie *Mef2-GAL4* letal ist. Die Linie *UAS-dPark9 RNAi 2* bringt mit allen Treibern lebensfähige Nachkommen hervor (Tabelle 15).

Linie	<i>actin-GAL4</i>	<i>elav-GAL4</i> (X)	<i>Th-GAL4</i>	<i>Mef2-GAL4</i>
<i>UAS-dPark9 RNAi 1</i>	letal	semiletal	lebensfähig	letal
<i>UAS-dPark9 RNAi 2</i>	lebensfähig	lebensfähig	lebensfähig	lebensfähig

Tabelle 15: Letalität der *UAS-dPark9 RNAi*-Linien 1 und 2 mit verschiedenen Treibern.

Im Rahmen der Bachelorarbeit von Nina Weber (2010) wurde die *knockdown*-Effizienz der zwei Linien mittels RT-PCR verglichen. Dabei zeigt sich, dass *UAS-dPark9 RNAi 1* die effektivere *knockdown*-Linie ist. L3-Larven der Kreuzung *UAS-dPark9 RNAi 1/+; da-GAL4/+* weisen eine *knockdown*-Effizienz von 86,8% auf im Gegensatz zu *da-GAL4/UAS-dPark9 RNAi 2* - Larven mit einer Reduktion um 67% (Abbildung 17; Weber, 2010).

Demnach könnte *dPark9* eine wichtige Rolle in der Entwicklung spielen, da ein ubiquitärer *knockdown* sowie ein *knockdown* in neuronalem oder muskulärem Gewebe Letalität zur Folge hat.

Parallel zu den RNAi-Linien wurden die Auswirkungen einer Überexpression von *dPark9* in *Drosophila* untersucht. Hierfür wurde die längste Isoform *dPark9H* in den Expressionsvektor pUAST kloniert, in Fliegen injiziert und stabile transgene Linien etabliert (Fiesel, 2013).

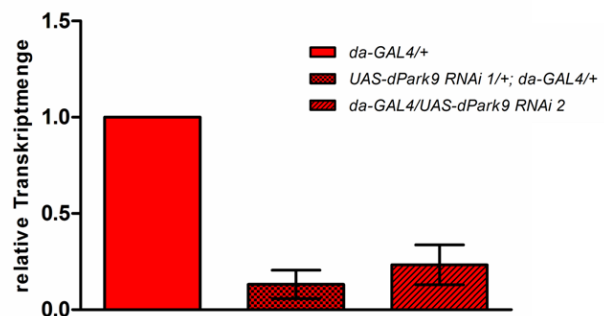


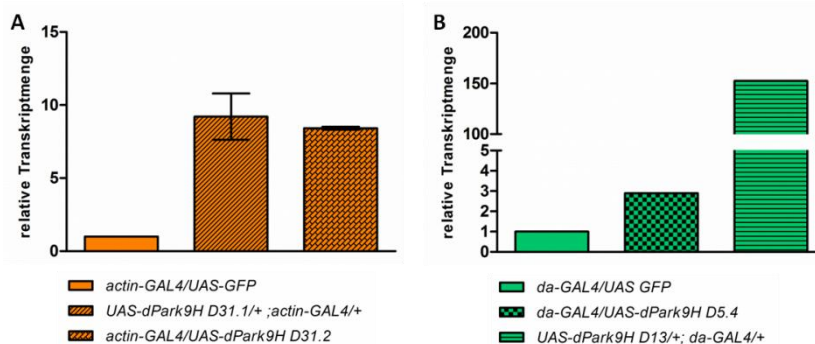
Abbildung 17: Analyse der *knockdown*-Effizienz bei den beiden Linien RNAi 1 und 2 mittels RT-PCR. RNAi 1 zeigt eine 87%ige Reduktion der relativen Transkriptmenge mit dem Treiber *da-GAL4*. Die Expression der schwächeren Linie RNAi 2 ist um 67% verringert (Weber, 2010).

Linie	<i>actin-GAL4</i>	<i>elav-GAL4</i> (X)	<i>Th-GAL4</i>	<i>Mef2-GAL4</i>
D2	semiletal	semiletal	lebensfähig	letal
D4	semiletal	lebensfähig	lebensfähig	letal
D5.4	semiletal	lebensfähig	lebensfähig	semiletal
D13	letal	semiletal	lebensfähig	letal
D17.1	lebensfähig	lebensfähig	lebensfähig	lebensfähig
D17.2	semiletal	lebensfähig	lebensfähig	semiletal
D17.4	semiletal	lebensfähig	lebensfähig	semiletal
D22.1	letal	lebensfähig	lebensfähig	semiletal
D22.3	semiletal	lebensfähig	lebensfähig	letal
D31.1	lebensfähig	lebensfähig	lebensfähig	letal
D31.2	lebensfähig	lebensfähig	lebensfähig	letal

**Tabelle 16: Charakterisierung der Letalität in den *dPark9H*-Überexpressionslinien mit verschiedenen Treiberlinien.** Die Kreuzungen erfolgten auf 25°C unter Standardbedingungen.

Diese Linien wurden mit unterschiedlichen Treibern auf Letalität überprüft (siehe Tabelle 16). Von elf Fliegenlinien sind zwei mit *actin-GAL4* letal und sechs weisen eine reduzierte Lebensfähigkeit (semiletal) auf. Die Expression in neuronalem Gewebe beeinflusst dagegen nur in zwei Linien die Lebensfähigkeit der Nachkommen.

Der Treiber *Mef2-GAL4* führt in zehn der elf Linien zu Letalität oder zu Semiletalität. Die Expression von *dPark9H* mit dem dopaminergen Treiber *Th-GAL4* zeigt wie bei den beiden RNAi-Linien keine Beeinträchtigung in der Lebensfähigkeit. Um zu überprüfen ob die Letalität mit der Expressionsstärke korreliert, wurden einige Linien mittels RT-PCR analysiert.



**Abbildung 18: Überprüfung der Überexpressionsstärke mittels RT-PCR.** (A) Ubiquitäre Überexpression von D31.1 zeigt eine 9,2 fache Hochregulierung im Vergleich zu D31.2 mit 8,4 fach. (B) Die Linie D5.4 weist eine 2,9 fache und D13 eine 152,4 fache Überexpression mit *da-GAL4* auf.

Für die Untersuchung der Lebenserwartung wurden die Linien D31.1 und D31.2 näher untersucht, da beide mit *actin*-, *elav*- und *Th-GAL4* keinen Phänotyp zeigen und mit *Mef2-GAL4* letal sind. Die RT-PCR ergibt eine um 9,2 fache Überexpression für D31.1 im Vergleich zu 8,4 fach für D31.2, so dass beide Linien fast gleich stark sind. Für die Lebens-

dauerversuche wurde im Folgenden die Linie D31.1 verwendet. Die Linien D5.4 und D13 zeigen mit *da-GAL4* eine 2,9 fache und 152,4 fache Hochregulierung der relativen *dPark9*-Transkriptmenge (Abbildung 18).

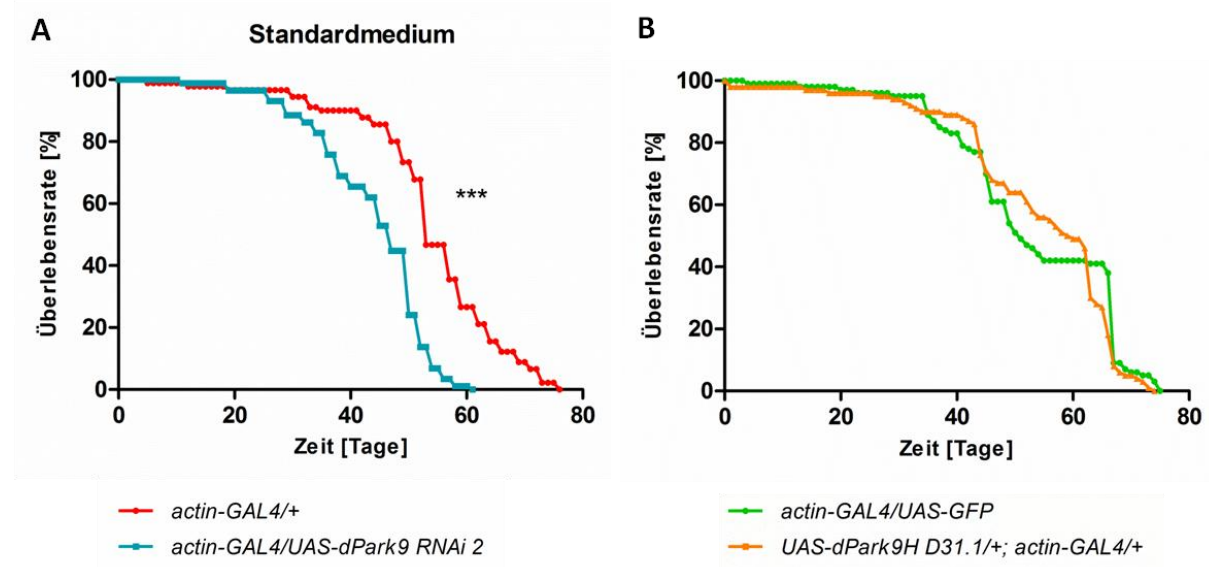
Die Reduktion oder Überexpression von *dPark9* führt mit *actin*- sowie *Mef2-GAL4* zu Letalität und mit *Elav-GAL4* in stark exprimierenden Linien zu Semiletalität. Somit hat eine ubiquitäre sowie eine spezifische Expression in Geweben wie Neuronen und Muskeln eine Reduktion der Lebensfähigkeit zur Folge. Für die allgemeine Fitness der Fliegen ist demnach eine definierte Menge an *dPark9* notwendig.



#### 4.4.2 Reduzierte Lebensdauer von *dPark9*-defizienten Fliegen

Um den Einfluss von *dPark9* auf die allgemeine Fitness von *D. melanogaster* zu untersuchen, wurde das Gen mit Hilfe des Treibers *actin-GAL4* ubiquitär hoch- oder runterreguliert. Für das Experiment wurden 100 Fliegen gleichmäßig in vier Gläser mit Standardmedium aufgeteilt und bei 25°C inkubiert (s. 3.7.).

Da die Linie *UAS-dPark9 RNAi 1* mit dem *actin-GAL4*-Treiber letal ist, wurde die schwächere Linie *UAS-dPark9 RNAi 2* verwendet. Unter Standardbedingungen erreichen die Kontrollfliegen ein maximales Alter von 76 Tagen. Der *knockdown* von *dPark9* führt zu einer Verkürzung der Lebensspanne auf 61 Tage (- 20%). Die mittlere Überlebensrate zeigt eine Reduktion der Lebensdauer von *RNAi 2* - Fliegen um sieben Tage (- 13%) im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 19A).



**Abbildung 19: Lebensdauer von *dPark9*-defizienten und *dPark9H*-überexprimierenden Fliegen auf Standardmedium.** (A) *Actin-GAL4/UAS-dPark9 RNAi 2* - Fliegen zeigen eine um 13% verminderte mittlere Lebensdauer und eine um 20% reduzierte maximale Lebensdauer.  $LD_{50}^{w1118} = 53$  Tage,  $LD_{100}^{w1118} = 76$  Tage,  $LD_{50}^{RNAi 2} = 46$  Tage,  $LD_{100}^{RNAi 2} = 61$  Tage. (B) Die mittlere Lebensdauer der Überexpressionsfliegen war neun Tage verlängert. Die maximale Überlebensdauer unterscheidet sich in nur einem Tag.  $LD_{50}^{GFP} = 51$  Tage,  $LD_{100}^{GFP} = 75$  Tage,  $LD_{50}^{D31.1} = 60$  Tage,  $LD_{100}^{D31.1} = 74$  Tage.  $P^{***} < 0,0001$ .

Die Analyse der Lebensspanne von *dPark9H*-Überexpressionsfliegen zeigt keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle (Abbildung 19B). Die mittlere Lebensdauer ist im Vergleich zur Kontrollgruppe um neun Tage verlängert (+ 18%), dieser Trend setzt sich aber im weiteren Verlauf nicht fort. Die maximale Lebensdauer unterscheidet sich in nur einem Tag, so dass kein positiver oder negativer Effekt durch die Expression von zusätzlichem *dPark9H* detektiert werden kann.

Die Untersuchung der Lebensspanne unter Standardbedingungen zeigt einen negativen Einfluss des *dPark9*-*knockdowns* auf die allgemeine Fitness. Die Überexpression von *dPark9H* beeinflusst die Lebensdauer der Fliegen hingegen nicht. Mit D31.1 wurde eine Linie verwendet, die nur eine schwache Überexpression zeigt (Abbildung 18), so dass sich eventuell keine Beeinträchtigung ausprägen kann.

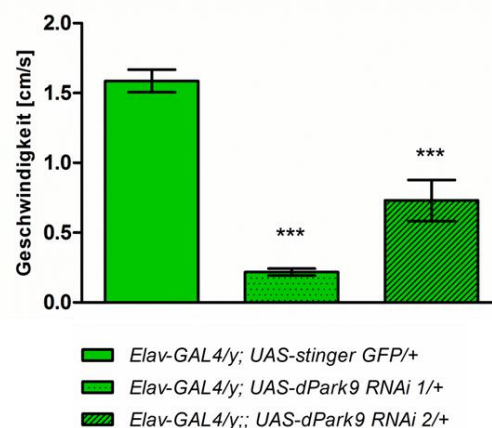
#### 4.4.3 Veränderungen der *dPark9*-Expression führen zu einer Reduktion der negativen Geotaxis

Ein charakteristisches Verhalten von *Drosophila* ist eine starke negative Geotaxis. Darunter versteht man, dass sich die Fliegen entgegen der Erdanziehungskraft kletternd fortbewegen. Dieses Verhalten gibt Aufschluss über die allgemeine Fitness und Beeinträchtigung der neuronalen Integrität und wurde bereits in anderen Parkinsonmodellen als Indikator verwendet (Feany und Bender, 2000).

Um zu überprüfen, ob und wie sich eine Reduktion bzw. eine Überexpression von *dPark9* auf die lokomotorischen Fähigkeiten der Fliegen auswirkt, wurden diese wie in 3.8.1 beschrieben getestet. Hierfür wurde der pan-neurale Treiber *Elav-GAL4* verwendet.

Beide RNAi - Linien zeigen eine signifikante Beeinträchtigung der lokomotorischen Fähigkeiten. Sieben Tage alte Kontrollfliegen *Elav-GAL4/y; UAS-stinger GFP/+* besitzen eine durchschnittliche Klettergeschwindigkeit von 1,58 cm/s. Ein *knockdown* von *dPark9* führt zu einer signifikanten Verschlechterung der negativen Geotaxis auf 0,22 cm/s (*Elav-GAL4/y; UAS-dPark9 RNAi 1/+*) und auf 0,73 cm/s (*Elav-GAL4/y;; UAS-dPark9 RNAi 2/+*) (Abbildung 20).

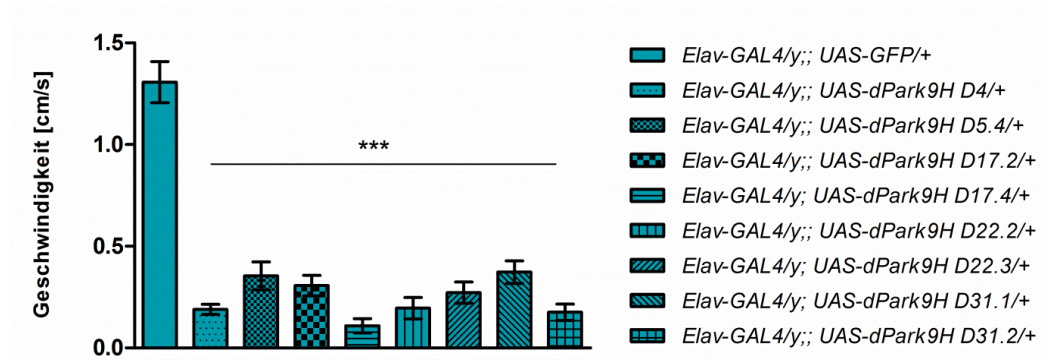
Dies entspricht einer Reduktion um 86% für die starke Linie RNAi 1 und um 54% für die Linie RNAi 2. Die Stärke des Kletterphänotyps spiegelt sich auch in der *knockdown*-Effizienz wieder (s. 4.4.1).



**Abbildung 20: Negative Geotaxis von sieben Tage alten *dPark9*-RNAi- Fliegen.** Die Kletterfähigkeit von *dPark9*-defizienten Fliegen ist um 86% (RNAi 1) und 54% (RNAi 2) reduziert. P \*\*\* < 0,0001.

Für die Analyse der Überexpression wurden zehn Tage alte Fliegen auf ihre negative Geotaxis untersucht. Alle mit *Elav-Gal4* (X) gekreuzten lebensfähigen Linien zeigen eine stark reduzierte Kletterfähigkeit (Abbildung 21). Die Durchschnittsgeschwindigkeit der Überexpressionslinien liegt bei 0,25 cm/s und ist im Vergleich mit der Kontrollgruppe (1,3 cm/s) deutlich verringert. Die am stärksten betroffene Linie *Elav-GAL4/y; UAS-dPark9H D17.4/+* weist nur noch eine Klettergeschwindigkeit von 0,11 cm/s auf. Dies entspricht einer 92%igen Reduktion im Vergleich zur Kontrolle *Elav-Gal4/y;; UAS-GFP/+*. Die fitteste Linie D31.1, bei der die Durchschnittsgeschwindigkeit bei 0,37 cm/s liegt, ist immer noch signifikant schlechter als die Kontrollgruppe (- 71,5%).

Somit zeigt sowohl der *knockdown* als auch die Überexpression von *dPark9* einen beeinträchtigenden Effekt auf die negative Geotaxis von *D. melanogaster*. Im Gegensatz zur Lebensdauer beeinflusst die Expression von *dPark9H* die Kletterfähigkeit deutlich.



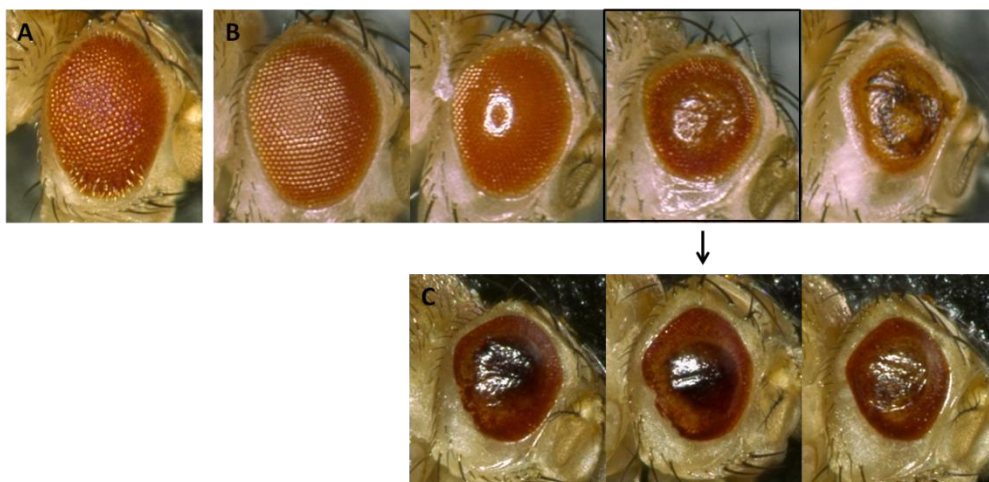
**Abbildung 21: Negative Geotaxis der Überexpressionslinien.** Alle Linien zeigen nach zehn Tagen einen starken Kletterphänotyp. Die Geschwindigkeit ist bei der schlechtesten Linie D17.4 um 91,6% und bei der schnellsten Linie D31.1 um 71,5% reduziert.  $P^{***} < 0,0001$ .

#### 4.4.4 Beeinflussung der Augenentwicklung durch *dPark9H*-Überexpression

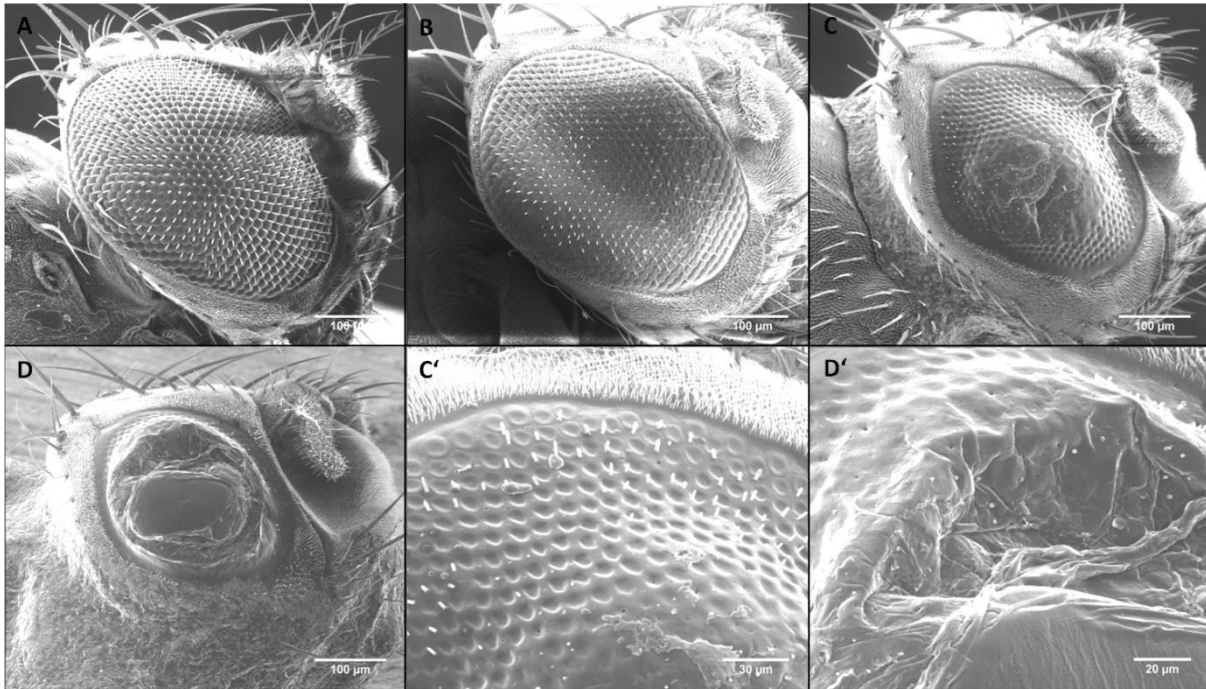
Für die Forschung an neurodegenerativen Erkrankungen wie Parkinson, Alzheimer und Chorea Huntington ist das Komplexauge von *Drosophila* ein ideales Modell, da die Auswirkungen und Interaktionen mit potentiell involvierten Genen leicht mitzuverfolgen sind (Jackson *et al.*, 1998; Feany und Bender, 2000; Guo *et al.*, 2003). Deshalb wurde sowohl der *knockdown* als auch die Überexpression von *dPark9* auf ihren Einfluss im Auge untersucht.

Mit keiner der beiden *dPark9-RNAi*-Linien kann ein Augenphänotyp beobachtet werden (persönliche Mitteilung Juan Navarro). Unter Verwendung des *gmr-GAL4*-Treibers (*glass multimer reporter*), der nach der morphogenetischen Furche aktiv ist, kann nur mit der Überexpressionslinie *UAS-dPark9H D13* ein Augenphänotyp erzeugt werden.

Dieser zeigt eine breite Varianz in der Morphologieausprägung: vom wildtypischen Komplexauge über einen *smooth*-Phänotyp bis hin zu apoptotischen Strukturen (Abbildung 22B). Durch Alterung verschlechtert sich ein mäßig ausgeprägter Phänotyp weiter, so dass nach sieben Tagen ebenfalls nekrotische Bereiche im Auge zu beobachten sind (Abbildung 22B markiertes Bild und C).



**Abbildung 22: Überexpression von *dPark9H* führt zu einem Augenphänotyp.** (A) Kontrolle *gmr-GAL4/+; UAS-GFP/+* zeigt ein wildtypisches Komplexauge. (B) Die Überexpressionfliegen *gmr-GAL4/UAS-dPark9H D13* weisen eine Varianz in der Phänotypausprägung auf. (C) Durch Alterung verschlechtert sich der Phänotyp weiter bis hin zu nekrotischem Gewebe. (A, B) Drei-fünf Tage alte Fliegen, (C) elf Tage alte ♂ Fliegen.



**Abbildung 23: Raster-EM-Aufnahmen vom *dPark9H*-Augenphänotyp.** (A) Die Kontrolle *gmr-GAL4/+; UAS-GFP/+* zeigt ein wildtypisches Auge. (B-D) Die Überexpression von *dPark9H* D13 erzeugt eine Varianz der Ausprägungsstärke des Phänotyps. Vom Verlust der Borsten und Einwölbung der Cornea (C') bis zum Zusammenbruch der Strukturen (D'). Sieben Tage alte ♂ Fliegen.

Eine genauere Betrachtung mit dem Raster-Elektronenmikroskop zeigt weitere Details. Ein leichter Phänotyp ist durch den Verlust der Borsten und Einwölbung der Cornea im zentralen Augenbereich gekennzeichnet. Bei mäßig betroffenen Augen beginnt die Auflösung der Strukturen von der Mitte des Auges aus, die bei starker Ausprägung das ganze Komplexauge betreffen kann (Abbildung 23B-D).

#### 4.4.5 *DPark9*-defiziente Fliegen zeigen im Gegensatz zu *dPark9H*-überexprimierenden Fliegen keine Degeneration der dopaminergen Neuronen

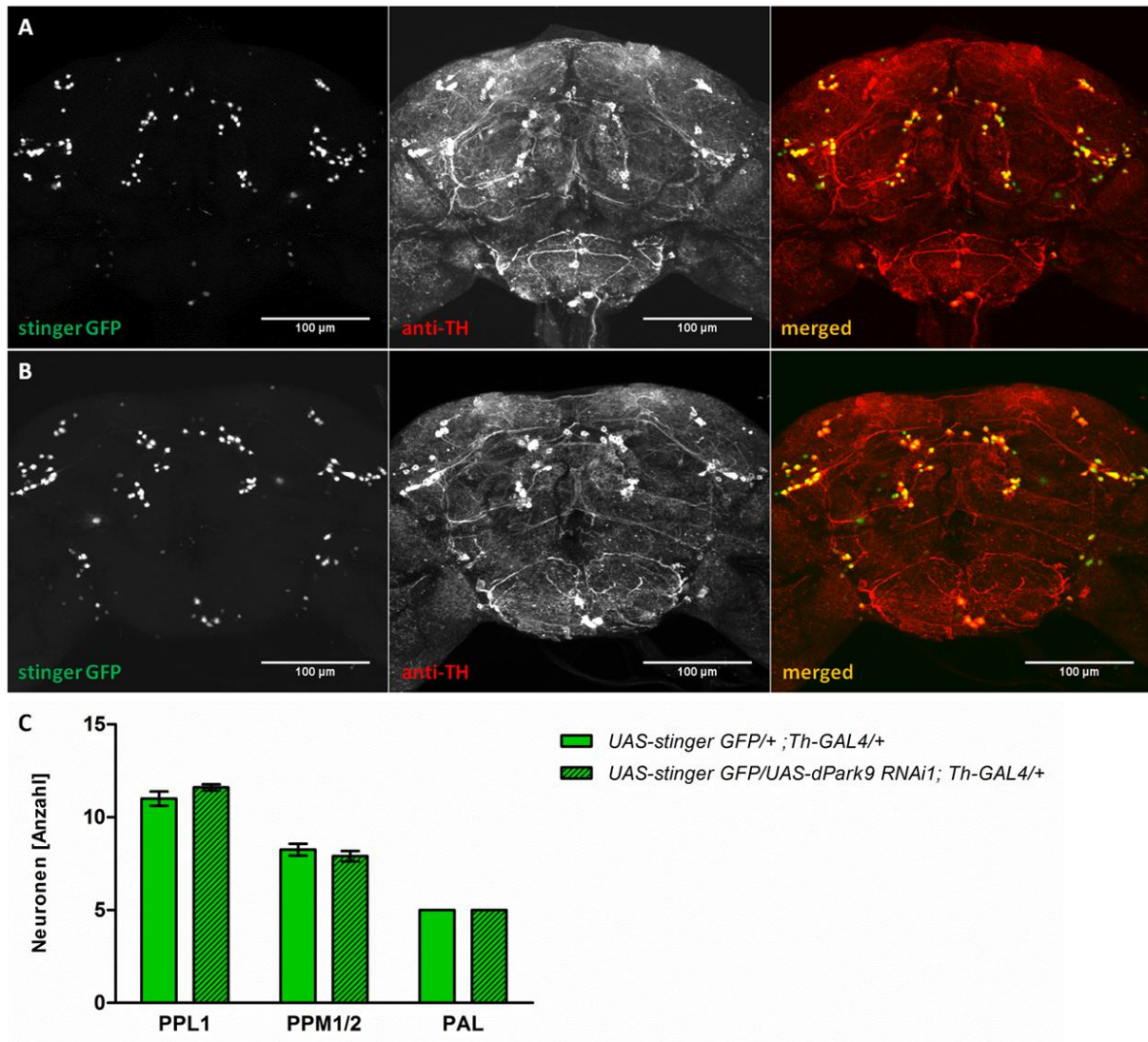
Charakteristisch für die Parkinsonerkrankung ist der Verlust von dopaminergen Neuronen in der *substantia nigra pars compacta* (SNc). Jedoch gibt es zum jetzigen Zeitpunkt noch keine histopathologischen Untersuchungen von Kufor-Rakeb Syndrom-Patienten und es ist somit unklar, ob sie dieselbe Pathologie wie Parkinsonpatienten aufweisen (Schultheis *et al.*, 2013). Aus diesem Grund wurde die Auswirkung einer veränderten *dPark9*-Expression auf die dopaminergen Neuronen im Modellorganismus *D. melanogaster* untersucht. Durch die Verwendung des Treibers *Th-GAL4* kann die Expression bzw. der *knockdown* eines beliebigen Gens in den dopaminergen Neuronen erfolgen. Die einzigen Ausnahmen stellen die PAM Neuronen dar (Friggi-Grelin *et al.*, 2003).

Für die Analyse der Neuronen in *Drosophila* wurden *dPark9*-defiziente Fliegen 60 Tage gealtert und wie in 3.3.1 beschrieben präpariert. Die Gehirne wurden dann mit dem Zeiss LSM 510 gescannt und mit der LSM Image Browser Software manuell ausgewertet. Es wurden nur die Neuronen gezählt, die sowohl eine anti-Th-Färbung aufweisen als auch kernlokalisiertes GFP exprimieren. Die Expression von GFP durch *Th-GAL4* führt, vermutlich auf Grund einer ektopischen Aktivität des Treibers, zu einer höheren Anzahl an markierten



Zellen im Vergleich zur anti-Th-Färbung, so dass eine Doppelfärbung ein exakteres Ergebnis liefert (White *et al.*, 2010).

Die Auszählung der PPL1-, PPM1- und PAM-Gruppen zeigt keine signifikante Degeneration der dopaminergen Neuronen. Ein Verlust von ein bis zwei Neuronen ist ebenfalls in der Kontrollgruppe zu detektieren, so dass diese Verminderung eine natürlich vorkommende Varianz darstellt (Abbildung 24).

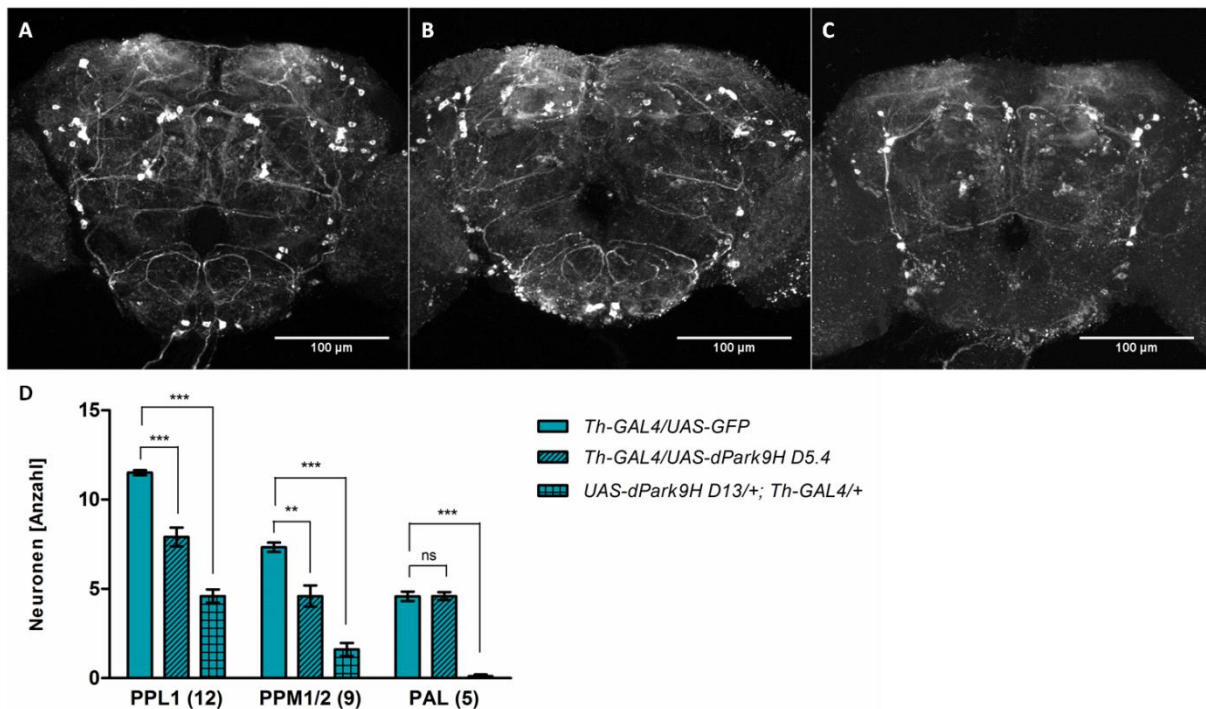


**Abbildung 24: Kein Verlust von dopaminergen Neuronen in *dPark9*-defizienten Fliegen.** 60 Tage alte Gehirne der Kontrolle *UAS-stinger GFP/+ ; Th-GAL4/+* (A) und des *knockdowns* *UAS-stinger GFP/UAS-dPark9 RNAi 1; Th-GAL4/+* (B) zeigen keine Neurodegeneration. (C) Keine der Neuronengruppen weist einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle auf (Blumenstock, 2012).

Neben der Analyse der dopaminergen Neuronen von *dPark9*-defizienten Fliegen wurden auch *dPark9H*-überexprimierende Fliegen auf einen Phänotyp hin untersucht. Es wurden die zwei Überexpressionslinien D5.4 und D13 zum Treiber *Th-GAL4* gekreuzt und die Fliegen 32 Tage lang unter Standardbedingungen gealtert.

Bei der Linie D5.4 ist eine Reduktion der PPL1 Neuronen von 12 auf 7,9 und in der PPM1/2 Gruppe von 9 auf 4,6 feststellbar. Neuronen der PAL Gruppe sind nicht betroffen. Die Anzahl PPL1 Neuronen in der Überexpressionslinie D13 verringert sich auf 4,6, die der PPM1/2 Gruppe zeigen nur noch 1,6 Neuronen und die PAL Neuronen auf 0,1 (Abbildung 25).

Die Auswertung zeigt eine Abhängigkeit der Neurodegeneration von der Expressionsstärke der verwendeten *dPark9H*-Linie. RT-Ergebnisse ergaben eine 2,9 fach erhöhte relativ *dPark9*-Transkriptmenge für die Linie D5.4 und um 152 fach für die Linie D13 mit dem Treiber *da-GAL4* (Abbildung 18B).

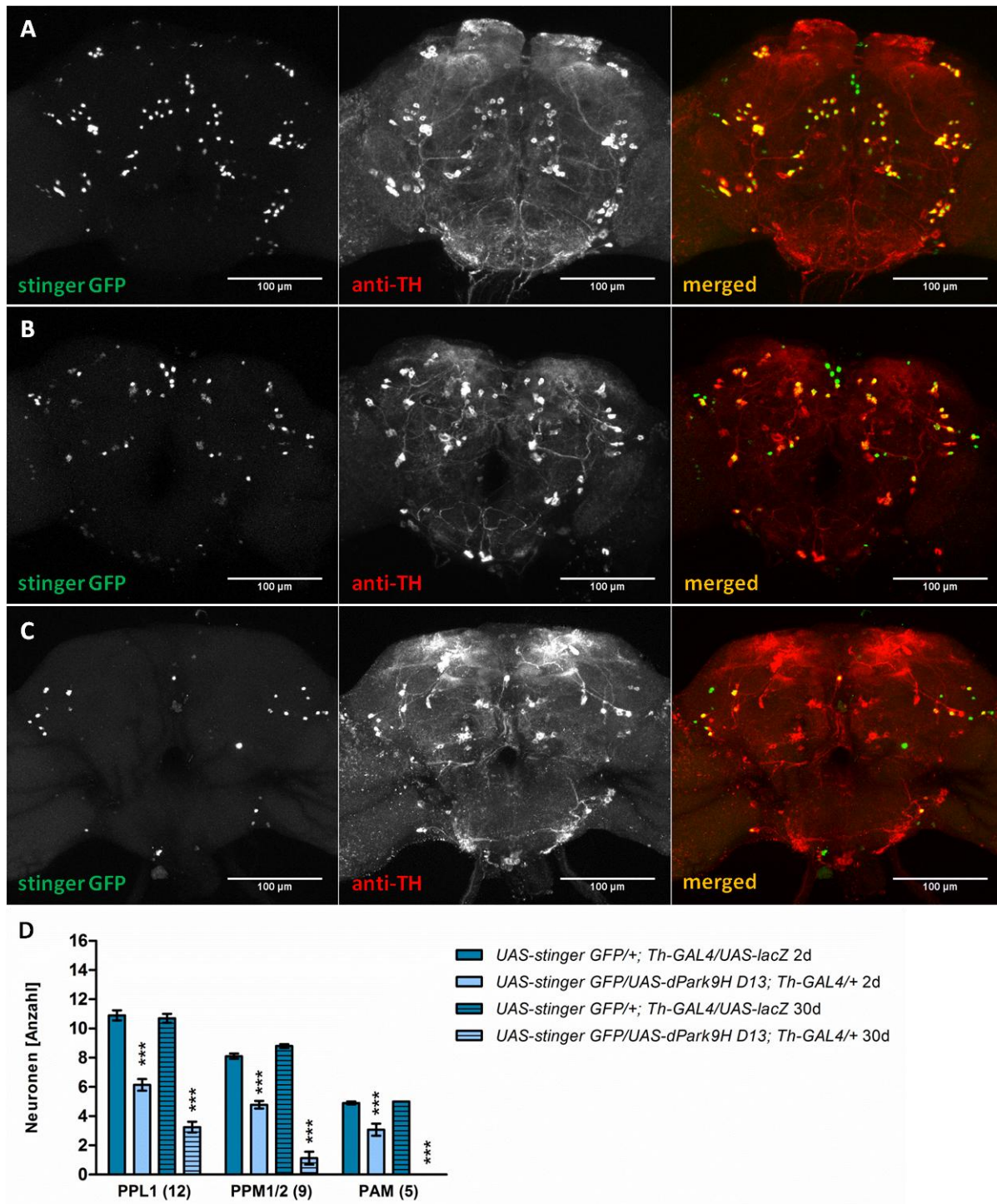


**Abbildung 25: Neurodegeneration ist abhängig von der Stärke der *dPark9H*-Überexpression.** (B) Die Linie D5.4 zeigt mit dem Treiber *Th-GAL4* einen Verlust der PPL1- und PPM1/2-Neuronen im Vergleich zur Kontrolle (A). Die PAL-Neuronen sind nicht betroffen. (C) Eine *dPark9H*-Überexpression mit der Linie D13 führt zu einer Verstärkung der Degeneration im Vergleich zu D5.4. Alle Neuronengruppen sind betroffen. (D) Die Übersicht über die unterschiedlich starke Degeneration in 32 Tage alten Fliegen in Abhängigkeit von der Überexpressionslinie.  $P^{**} = 0,0013$ ;  $P^{***} < 0,0001$ .

Um zu überprüfen, ob die Neurodegeneration auf Grund der Alterung auftritt oder ein entwicklungsspezifischer Phänotyp vorliegt, wurden die Gehirne von zwei und 30 Tage alten *UAS-dPark9H D13* - Fliegen untersucht. Zur besseren Auswertung der Neuronen wurde zusätzlich kernlokalisiertes GFP exprimiert.

Wie man in Abbildung 26 sehen kann, zeigt die Überexpression von *dPark9H* bereits in zwei Tage alten Fliegen einen Verlust an dopaminergen Neuronen in allen drei Gruppen. Die durchschnittliche Anzahl der PPL1-Neuronen verringert sich von 10,9 (Kontrolle) auf 6,1 Neuronen. Ebenso reduzieren sich die PPM1/2-Neuronen von 8,1 auf 4,8, sowie die Neuronen der PAL-Gruppe von 4,9 auf 3,1 Neuronen. Durch die 30 tägige Alterung schreitet die Degeneration weiter fort: es sind nur noch 3,3 PPL1-, 1,1 PPM1/2- und keine PAL-Neuronen mehr detektierbar (Abbildung 26).

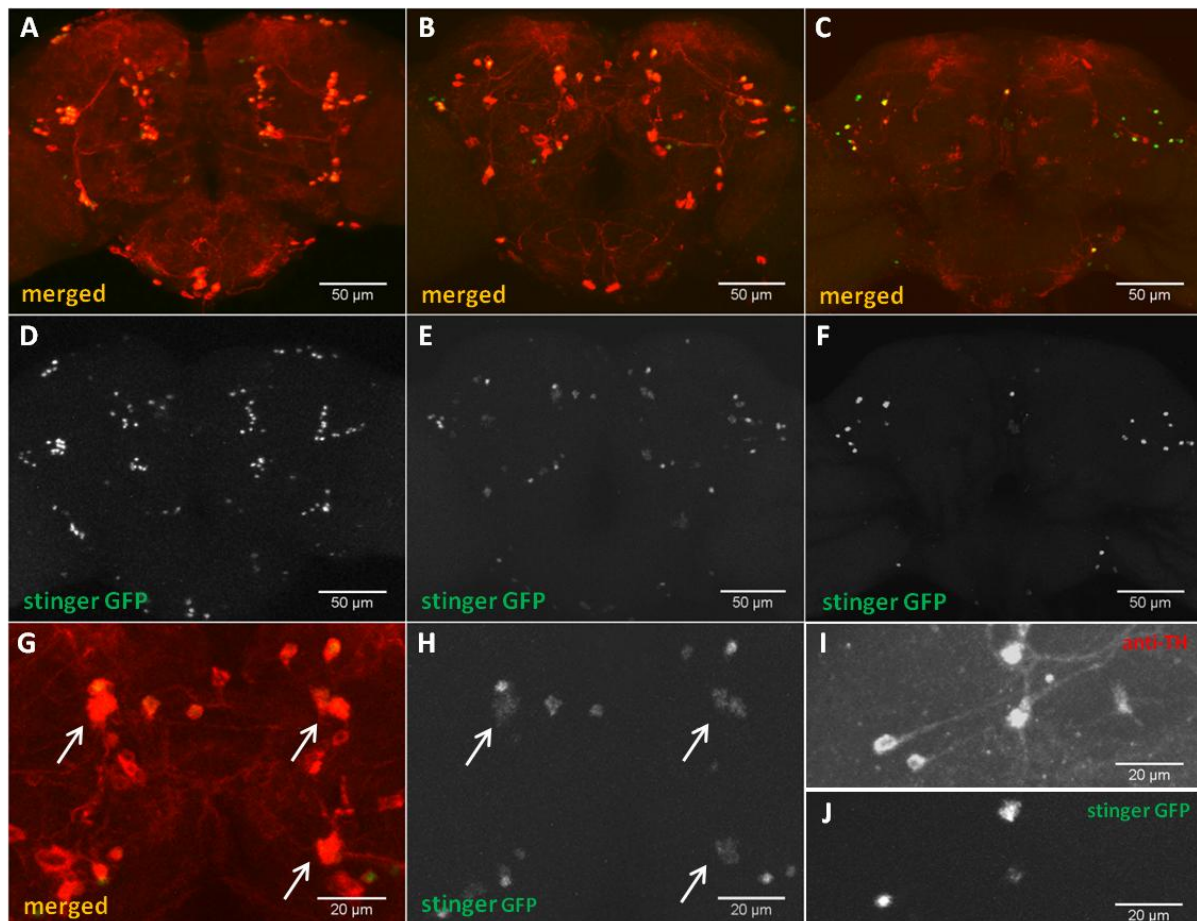
Somit lässt sich sagen, dass die Überexpression von *dPark9H* bereits in der Entwicklung einen negativen Einfluss auf die dopaminergen Neuronen ausübt. Dieser Effekt setzt sich in der Adultphase weiter fort und führt zu einer progressiven Degeneration.



**Abbildung 26: Überexpression von *dPark9H* führt zu einem Verlust von dopaminergen Neuronen.** (A) Die Kontrolle *UAS-stinger GFP/+; Th-GAL4/UAS-lacZ* 2d zeigt die normale Anzahl an Neuronen in PPL1, PPM1/2 und PAL. (B) Die Überexpression von *dPark9H* in dopaminergen Neuronen führt in zwei Tage alten Fliegen zu einer Degeneration. (C) Nach 30 Tagen ist der Verlust der Neuronen in *UAS-stinger GFP/UAS-dPark9H D13; Th-GAL4/+* - Fliegen noch weiter fortgeschritten. (D) Übersicht über die Degeneration der einzelnen Neuronengruppen durch Alterung.  $P^{***} < 0,0001$ .



In *dPark9H*-überexprimierenden Fliegen konnte nicht nur ein Verlust an dopaminergen Neuronen festgestellt werden, sondern auch eine Verringerung der GFP-Signalintensität (Abbildung 27). Diese ist bereits in Neuronen verringert, die noch eine normale anti-Th-Färbung aufweisen. Des Weiteren zeigt sich eine diffuse Verteilung des GFPs im Cytoplasma, das normalerweise ausschließlich im Zellkern lokalisiert ist. Diese gestörte Neuronenmorphologie ist bereits in zwei Tage alten *dPark9H*-überexprimierenden Gehirnen detektierbar (Abbildung 27H) und stellt eine einfache Möglichkeit dar, die Integrität der Neuronen zu analysieren.



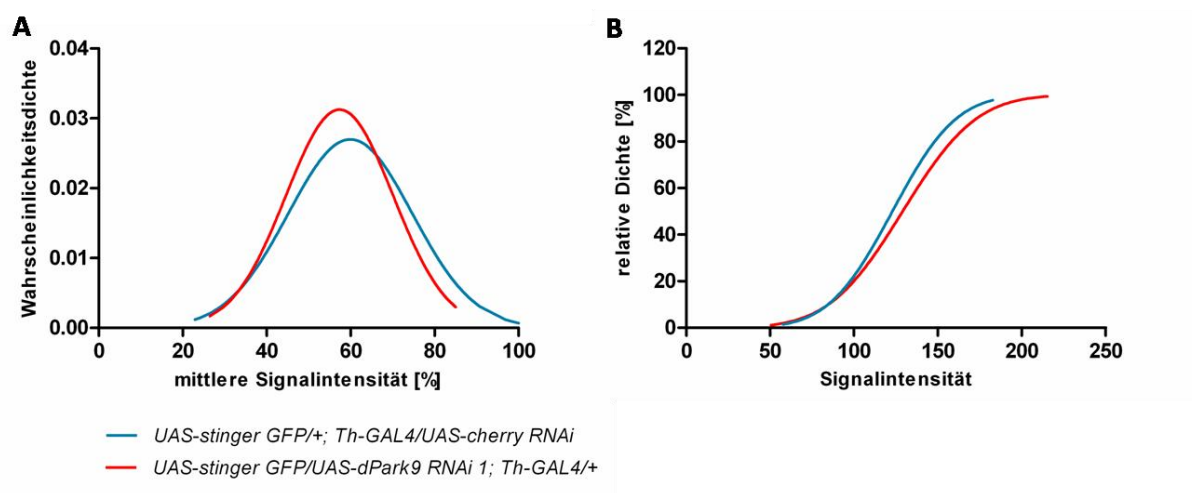
**Abbildung 27: Verlust von dopaminergen Neuronen und des GFP-Signals in *UAS-stinger GFP/UAS-dPark9H D13; Th-GAL4/+* - Fliegen.** Zwei Tage alte *dPark9H*-Überexpressionsfliegen (B, E, G, H) zeigen eine Degeneration der dopaminergen Neuronen sichtbar durch den Verlust der anti-Th-Färbung und des GFP-Signals im Vergleich zur Kontrolle *UAS-stinger GFP/+; Th-GAL4/UAS-lacZ* (A, D). Die Neurodegeneration ist altersabhängig wie in 30 Tage alten Überexpressionsfliegen zu sehen (C, F). In PPL1-Neuronen (30d) zeigt sich bereits eine Reduktion des GFP-Signals bevor ein Verlust der Anti-Th-Färbung zu erkennen ist (I, J).

#### 4.4.6 Reduktion der GFP-Signalintensität in dopaminergen Neuronen in jungen *dPark9H*-überexprimierenden und alten *dPark9*-defizienten Fliegen

Da kein Verlust von dopaminergen Neuronen in *dPark9-knockdown*-Fliegen detektierbar war, wurde die Intensität des GFP-Signals analysiert. Es konnte bereits in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass eine  $\alpha$ -Synuclein-Überexpression in dopaminergen Neuronen zu einer Reduktion des GFP-Signals führt (Botella *et al.*, 2008, Bayersdorfer *et al.*, 2010). Ein schwächeres GFP-Signal kann somit als eine Beeinträchtigung der Zelle oder als Vorstufe zum Zelltod interpretiert werden (Navarro *et al.*, 2014).

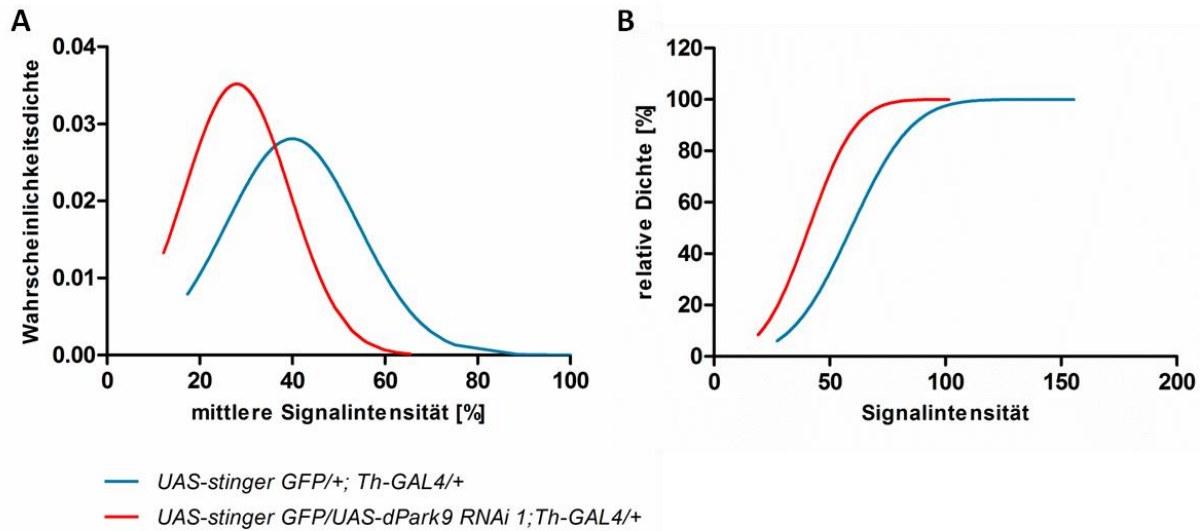
Die Fliegen wurden sieben Tage auf Standardfutter gehalten und wie in 3.3.5 beschrieben präpariert. Das GFP-Signal wurde mit der ImageJ Software analysiert und die Daten mit der Prism 6 Software ausgewertet.

Für die Normalverteilung ist die Signalintensität der Neuronen auf die Maximalintensität der Kontrolle normalisiert. Der *knockdown UAS-stinger GFP/+; Th-GAL4/UAS-dPark9 RNAi 1* zeigt dabei eine leichte Verringerung des mittleren Signalintensität im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 28A). Um eine Missinterpretation der Ergebnisse auf Grund von unterschiedlicher Anzahl an Neuronen auszuschließen, wurden die Daten zusätzlich als kumulative Verteilung aufgetragen (Abbildung 28B). Auch hier ist kein signifikanter Unterschied in der Verteilung feststellbar.



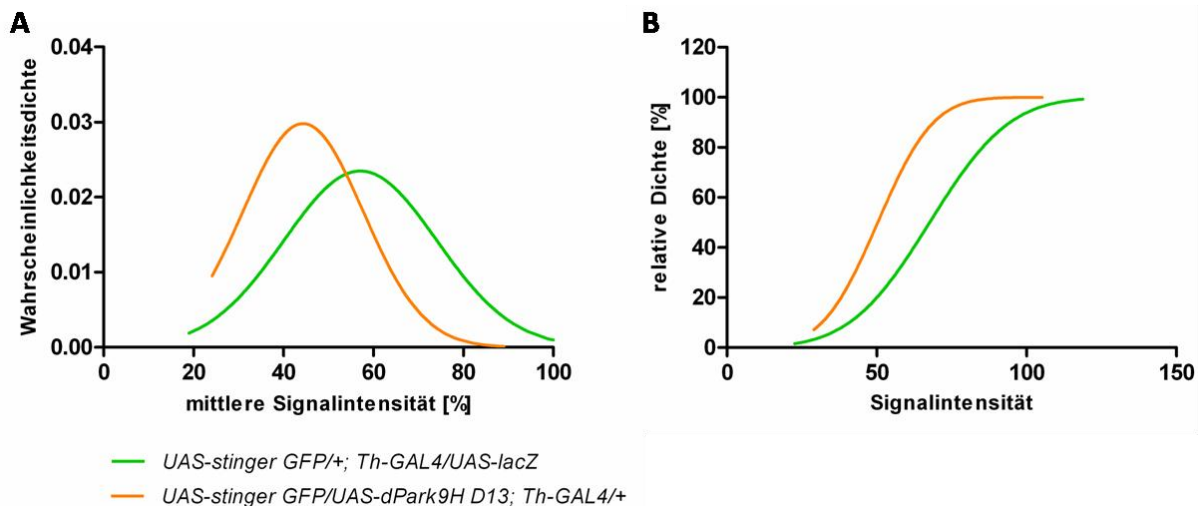
**Abbildung 28: Quantifizierung der GFP-Signalintensität zeigt keinen Unterschied in sieben Tage alten *dPark9-knockdown*-Gehirnen.** In der Normalverteilung des GFP-Signals der beiden Genotypen (A) und der kumulative Verteilung (B) ist kein signifikanter Unterschied feststellbar.  $P = 0,0186$ .

In 49 Tage alten *dPark9*-defizienten Fliegen zeigt sich eine leichte Reduktion in der GFP-Signalintensität, die sich in einer Linksverschiebung der Kurve bemerkbar macht (Abbildung 29A). Der Median der *knockdown*-Fliegen ist im Vergleich zur Kontrolle um 30% reduziert. In der kumulativen Verteilung ist der Unterschied zwischen den beiden Genotypen noch deutlicher zu erkennen (Abbildung 29B).



**Abbildung 29: Reduktion der GFP-Signalintensität in 49 Tage alten *dPark9*-defizienten Fliegen.** (A) Die mittlere Signalintensität der *knockdown*-Fliegen ist im Vergleich zur Kontrolle verringert, was sich in einer nach links verschoben Kurve darstellt. (B) Die Trennung der beiden Genotypen ist in der kumulativen Verteilung klar zu erkennen.  $P^{****} < 0,0001$ .

Im Gegensatz zum *knockdown* von *dPark9* erzeugt die Überexpression von *dPark9H* in wenige Tage alten Fliegen einen Unterschied in der GFP-Intensität wie in 4.4.5 bereits beschrieben. Der Median der Überexpressionslinie ist unter Standardbedingungen im Vergleich zur Kontrolle um 27% verringert (Abbildung 30A). Die kumulative Verteilung zeigt ebenfalls einen signifikanten Unterschied zwischen den Kurven (Abbildung 30B).



**Abbildung 30: Reduzierte GFP-Signalintensität in sieben Tage alten *dPark9H*-Überexpressionsfliegen.** (A) Die Kurve der Überexpressionsfliegen zeigt eine Linksverschiebung im Vergleich zur Kontrolle. (B) In der kumulativen Verteilung ist deutlich der Unterschied zwischen den beiden Genotypen zu erkennen.  $P^{****} < 0,0001$ .

Die Analyse der GFP-Signalintensität zeigt keine Veränderung in der Signalstärke in jungen RNAi - Fliegen, jedoch in 49 Tage gealterten *dPark9*-defizienten Fliegen. Auch wenn kein

Verlust an Neuronen feststellbar ist (s. 4.4.5), so hat die Verringerung der *dPark9*-Expression auf lange Sicht einen negativen Einfluss auf die Integrität der dopaminergen Neuronen. Im Gegensatz dazu führt die Überexpression von *dPark9H* nicht nur zu einem Verlust von Neuronen, sondern auch bereits in sieben Tage alten Fliegen zu einem reduzierten GFP-Signal. Somit stört eine Erhöhung der *dPark9*-Menge die Funktion der Neuronen stärker als dessen Reduktion.

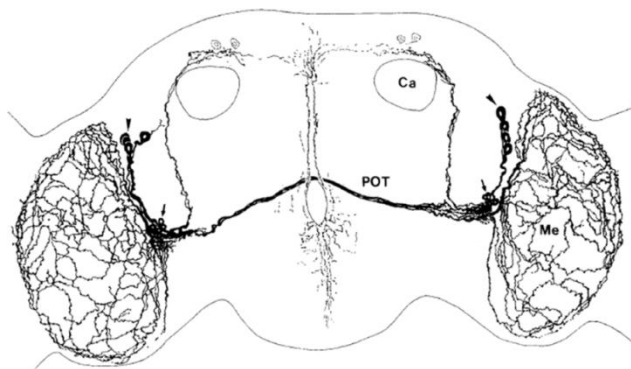
#### 4.4.7 Keine Degeneration von PDF-Neuronen durch die Überexpression von *dPark9H*

Bisher wurde der Einfluss von *dPark9* auf Neuronen nur im dopaminergen System analysiert. Um zu überprüfen ob *dPark9* auch einen Einfluss auf andere Neuronen hat, wurden hier die PDF-Neuronen untersucht.

PDF steht für *pigment-dispersing factor* und ist ein Neuropeptid, das von ventral-lateralen Neuronen (LNvs) sekretiert wird. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Synchronisation und Rückstellung von circadianen Neuronen (Renn *et al.*, 1999; Lear *et al.*, 2009).

Die Analyse dieser Neuronen wird durch ihre definierte Anzahl an Zellen erleichtert. So bestehen die *large*-LNvs aus vier bis fünf und die *small*-LNvs aus fünf Neuronen (Abbildung 31).

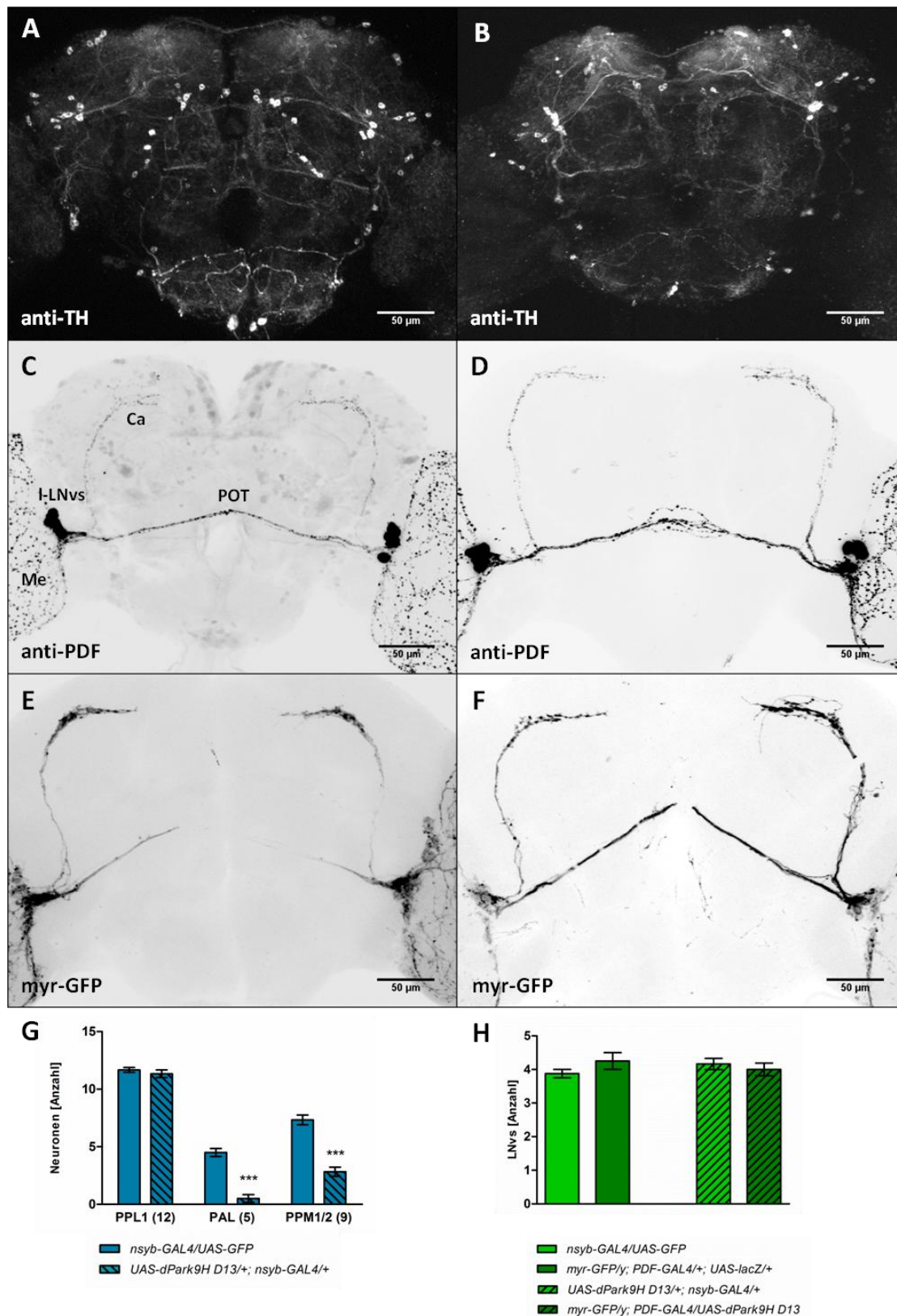
Des Weiteren ist es bei den PDF-Neuronen möglich sich nicht nur auf die Zellkörper zu konzentrieren, sondern auch deren Projektionen zu untersuchen, was mittels der anti-Th-Färbung nur schwer möglich ist.



**Abbildung 31: Übersicht über PDF-Neuronen.** Die PDF-Neuronen I-LNvs (Dreiecke) und s-LNvs (Pfeile) liegen an der anterioren Basis der Medulla (Me), von wo Projektionsfasern in die selbige ziehen. Weitere Fasern ziehen zum posterior optischen Bereich (POT) und zu den Kelchen der Pilzkörper (Ca) (abgeändert nach Helfrich-Förster und Homberg, 1993).

Die Überexpression von *dPark9H* im gesamten Nervensystem mittels des Treibers *nsyb-GAL4* führt zu einem Verlust der dopaminergen Neuronen in 27 Tage alten Fliegen. Besonders betroffen sind die Gruppen PAL mit einem Verlust von 89% und PPM1/2 mit einer 61%igen Reduktion der Neuronen. Auf die Anzahl der PPL1-Neuronen hat die Überexpression hingegen keinen Einfluss (Abbildung 32B, G).

Die Auswirkung einer erhöhten *dPark9H*-Menge auf die PDF-Neuronen wurde mittels anti-Th-Färbung in 26 Tage alten Fliegen untersucht. Zur besseren Ansicht wurde für die Bildprojektionen die negative Ansicht verwendet. Es ist weder eine Reduktion der I-LNvs noch eine Veränderung in den Projektionen der PDF-Neuronen zu detektieren (Abbildung 32D). Beim *knockdown* von *dPark9* konnte ebenfalls kein Phänotyp festgestellt werden (Blumenstock, 2012).



**Abbildung 32: Analyse der PDF-Neuronen in *dPark9H*-überexprimierenden Fliegen zeigt keine Degeneration.** Die neuronale Expression von *dPark9H* mit dem Treiber *nsyb-GAL4* führt zu einem Verlust der dopaminergen Neuronen (B) in 27 Tage alten Fliegen im Vergleich zur Kontrolle (A, G). Die Expression von *dPark9H* mit *nsyb-GAL4* (D) als auch mit *myr-GFP; PDF-GAL4* (F) hat keinen Einfluss auf die PDF-Neuronen. Die Fliegen sind 26 Tage (*nsyb-GAL4*) und 25 Tage (*myr-GFP; PDF-GAL4*) alt. (H) Ein Vergleich der Genotypen zeigt, dass mit zwei verschiedenen Treibern kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der PDF-Neuronen festgestellt werden kann.  $P^{***} < 0,0001$ .



Da nicht bekannt ist, ob *nsyb-GAL4* überhaupt in den PDF-Neuronen exprimiert, und wenn ja wie stark, wurde zur Überprüfung *dPark9H* mit dem Treiber *myr-GFP*; *PDF-GAL4* überexprimiert. Durch die gleichzeitige Expression von myristoyliertem GFP werden die Membranen der PDF-Neuronen markiert und eine Antikörperfärbung überflüssig. Sowohl bei der Verwendung des Treibers *nsyb-GAL4* als auch von *myr-GFP*; *PDF-GAL4* zeigt die Analyse der LNvs keinen signifikanten Unterschied in der Neuronenanzahl (Abbildung 32H). Durch den Vergleich der beiden Treiber konnte festgestellt werden, dass das Fehlen einer Degeneration der PDF-Neuronen nicht auf Grund eines falsch verwendeten Treibers entstand. Vielmehr übt *dPark9* keinen erkennbaren Einfluss auf die Integrität der PDF-Neuronen aus und eine Beeinträchtigung konnte bisher nur für dopaminerge Neuronen gezeigt werden.

#### 4.4.8 Analyse der indirekten Flugmuskulatur

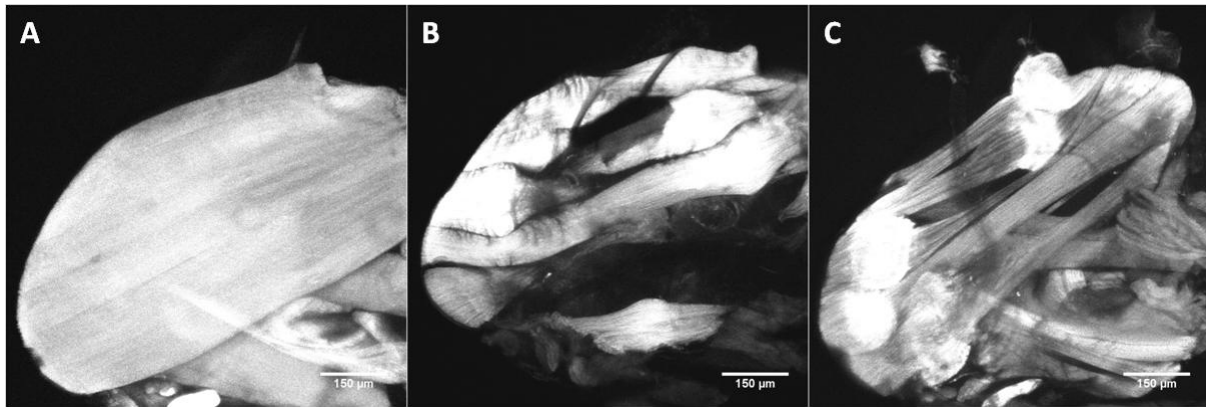
Bei den beiden Parkinsonmutationen *Pink* und *Parkin* konnte in *Drosophila* eine Degeneration der indirekten Flugmuskulatur (IFM) nachgewiesen werden (Greene *et al.*, 2003; Clark *et al.*, 2006). Aus diesem Grund wurden der Einfluss des *dPark9-knockdowns* sowie dessen Überexpression auf die IFM untersucht. In den folgenden Versuchen wurden die dorsal longitudinalen Muskeln (DLM) der IFM analysiert, die sich von den dorsoventralen Muskeln (DVM) anatomisch als auch funktionell unterscheiden.

Um einen *knockdown* von *dPark9* im Muskel zu erreichen, wurde der GAL4-Treiber *Myocyte enhance factor-2 (Mef2)* verwendet. Wenn möglich in der Kombination mit *UAS-GFP GMA*, da dieses die Markierung der Muskeln ermöglicht. Bei diesem Konstrukt wurde die Aktin-Bindedomäne des *Drosophila* Moesins mit einem GFP getaggt und bindet stark an das in fast allen Zellen vorkommende F-Aktin (Bloor und Kiehart, 2001; Dutta *et al.*, 2002).

##### 4.4.8.1 *DPark9-RNAi 1* - Fliegen zeigen einen Muskelphänotyp der DLM

Da die starke *UAS-dPark9 RNAi 1*- Linie auf 25°C letal ist, wurden die Kreuzungen auf 18°C angesetzt. Für die Untersuchung der DLM wurden die Fliegen mit CO<sub>2</sub> betäubt und null (am Tag des Schlüpfens) und zehn Tage alte Fliegen wie in 3.3.2 präpariert.

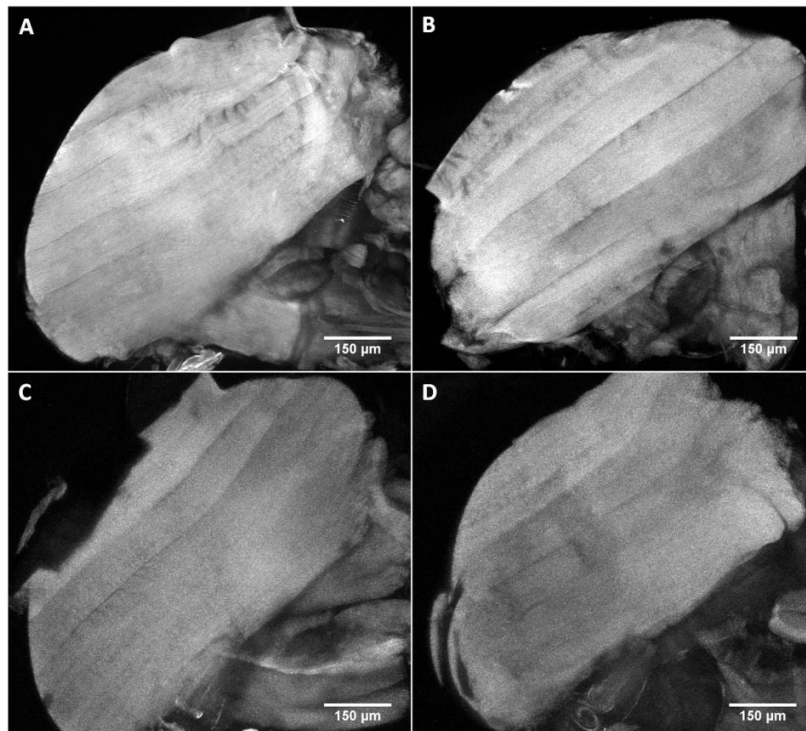
Bei der Kontrolle ist die einheitliche Struktur der sechs Muskelstränge der DLM klar zu erkennen, wohingegen sich bei *UAS-dPark9 RNAi 1/+; Mef2-GAL4, UAS-GFP-GMA/+* - Fliegen schon an Tag null ein Muskelphänotyp zeigt. Es sind alle Muskelstränge vorhanden, die jedoch eine unregelmäßige Struktur aufweisen. Die Muskelansätze sind verdickt, während die Mitte der Stränge sich verschmälert (Abbildung 33). Im Gegensatz zum Phänotyp von *Pink* und *Parkin* sind die Fasern zwischen den beiden Ansatzstellen jedoch zusammenhängend. Da der Phänotyp bereits beim Schlüpfen vorliegt, deuten die Ergebnisse darauf hin, dass eine Reduktion von *dPark9* während der Entwicklung die Prozesse für die Differenzierung der DLM beeinträchtigt.



**Abbildung 33: Knockdown von *dPark9* führt zu einem Phänotyp in der DLM.** Zehn Tage alte Kontrollfliegen *Mef2-GAL4, UAS-GFP-GMA/+* besitzen eine wildtypische IFM (A). *UAS-dPark9 RNAi 1/+; Mef2-GAL4, UAS-GFP-GMA/+* - Fliegen zeigen am Tag null (B) und Tag zehn (C) einen Muskelphänotyp. GFP-markiertes F-Aktin der DLM.

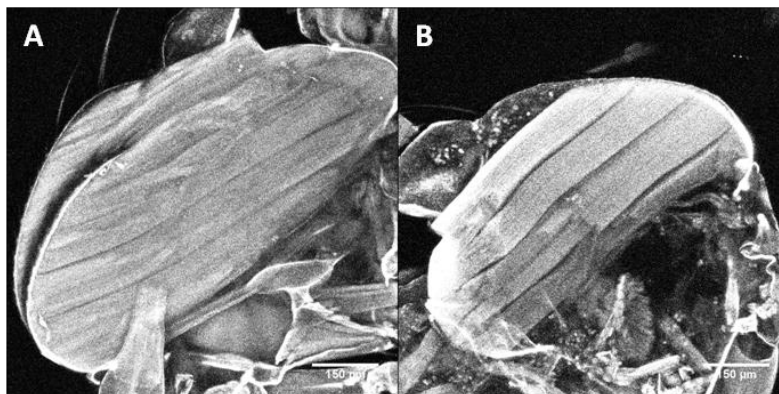
#### 4.4.8.2 Entwicklungsphänotyp der DLM

Um zwischen einem Entwicklungs- oder Alterungsphänotyp differenzieren zu können, wurde das *UAS-GAL80ts*-System verwendet. Die Kreuzung fand auf 18°C statt und die geschlüpften Fliegen wurden einen und 30 Tage bei 29°C inkubiert. Die Kontrollen zeigen eine normale DLM sowohl nach einem Tag als auch nach 30 Tagen auf 29°C. Die Schnitte der *knockdown*-Fliegen weisen ebenfalls keine Veränderung der Muskelstruktur auf. (Abbildung 34). Somit führt eine Reduktion der *dPark9*-Expression im Adultstadium zu keiner Beeinträchtigung der DLM. Auch nach 30 Tagen ist keine Veränderung in der Muskelmorphologie feststellbar. Der Phänotyp ist demnach durch Störungen in der Entwicklung entstanden und nicht durch Degeneration der Muskelfasern.



**Abbildung 34: Knockdown von *dPark9* im adulten Stadium mittels des *UAS-Gal80ts*-System erzeugt keinen Muskelphänotyp.** *Cyo/+; Mef2-GAL4, UAS-GFP-GMA/tub-GAL80ts*-Fliegen, die einen (A) und 30 Tage (C) auf 29°C inkubiert wurden, zeigen eine wildtypische DLM. In den *knockdown*-Fliegen *UAS-dPark9 RNAi1/Cyo; Mef2-GAL4, UAS-GFP-GMA/tub-GAL80ts* ist keine Veränderung der DLM zu beobachten (B, D). Anti-Phalloidininfärbung.

#### 4.4.8.3. Überexpression von *dPark9H* zeigt keinen Muskelphänotyp



**Abbildung 35: Die Überexpression von *dPark9H* führt zu keinem Muskelphänotyp der DLM.** Sowohl die Kontrolle *Mef2-GAL4/UAS-GFP* (A) als auch die Überexpression *Mef2-GAL4/UAS-dPark9H D22.1* (B) zeigen eine wildtypische DLM. Anti-Phalloidininfärbung.

Der Einfluss der *dPark9H*-Überexpression auf die Muskelintegrität wurden mit den beiden Responderlinien *UAS-dPark9H D22.1* und *D31.1* getestet. Beide Linien bringen auf 25° nur wenige bzw. gar keine Nachkommen hervor, sodass die Kreuzung auf 18°C ausgeführt wurde (Tabelle 16).

Die Kontrolle als auch die Überexpression *D22.1* zeigt keine Beeinträchtigung der

DLM (Abbildung 35). Trotz der geringeren Entwicklungstemperatur schlüpfen bei der Linie *UAS-dPark9H D31.1* keine Nachkommen. Somit lässt sich feststellen, dass eine starke Überexpression von *dPark9H* in der Muskulatur zu Letalität führt. Eine mäßige Überexpression wie bei der Linie *D22.1* zeigt keine Auswirkungen auf die DLM.

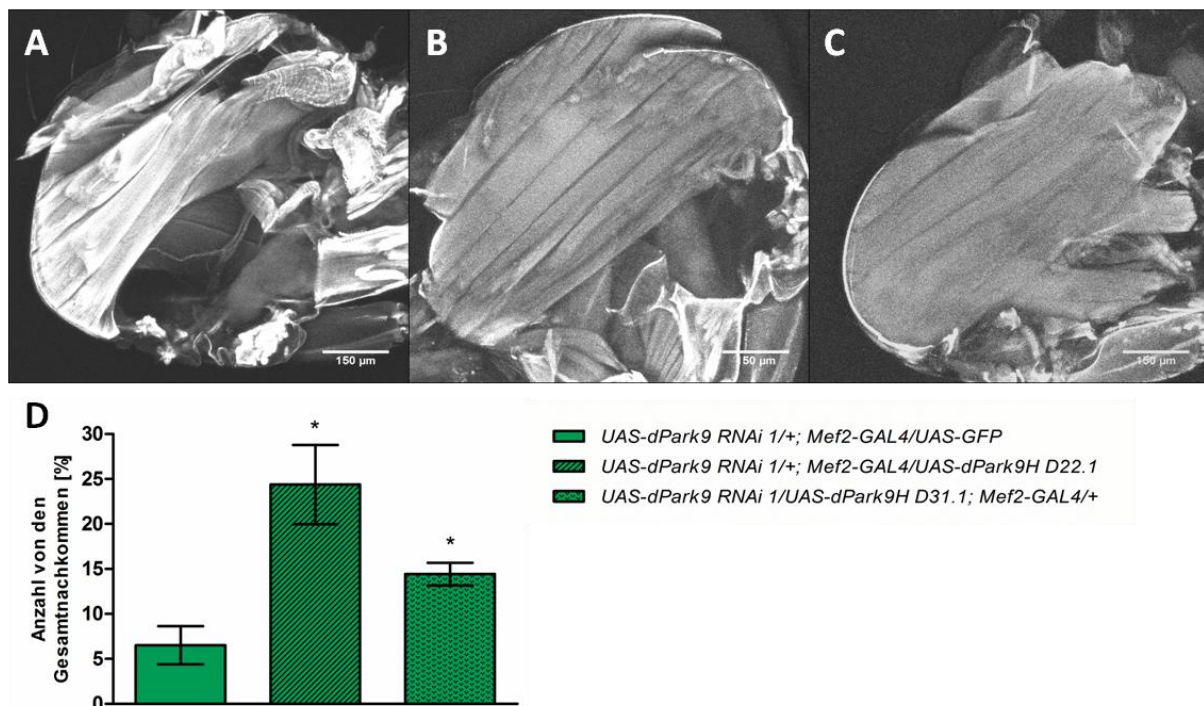
#### 4.4.8.4 Spezifität des *dPark9 RNAi 1*- Phänotyps

Um zu überprüfen, ob der beobachtete Muskelphänotyp in *dPark9*-defizienten Fliegen tatsächlich auf Grund des *knockdowns* zustande kommt oder ein *off-target*-Effekt durch die Interaktion mit einer anderen mRNA ist, wurde *dPark9H* im RNAi 1 - Hintergrund überexprimiert.

Die Kontrolle *UAS-dPark9 RNAi 1/+; Mef2-GAL4/UAS-GFP* zeigt den bereits bekannten Phänotyp der DLM. Die gleichzeitige Überexpression der Linien D22.1 und D31.1 im *knockdown*-Hintergrund führt zu einer Wiederherstellung der DLM. In beiden Fällen kann eine wildtypische DLM beobachtet werden (Abbildung 36A-C).

Des Weiteren ist auch eine Verbesserung in der Schlupfrate der *Rescue*-Fliegen feststellbar. Hierfür wurden alle männlichen Fliegen aus einer Kreuzung ausgezählt und der Anteil der einzelnen Genotypen im Verhältnis zur Gesamtnachkommenschaft berechnet. So sind bei der Kreuzung *UAS-dPark9 RNAi1/Cyo; Mef2-GAL4/TM6B,gal80* mit *UAS-GFP* nur 6,5% der Gesamtnachkommen Fliegen mit dem Genotyp *UAS-dPark9 RNAi1/+; Mef2-GAL4/UAS-GFP*. Durch die Kreuzung der Treiberlinie zu *UAS-dPark9H D22.1* bzw. *D31.1* erhöht sich dieser Anteil auf 24,4% und 14,4% (Abbildung 36D).

Durch diesen Versuch konnte gezeigt werden, dass der Muskelphänotyp von *dPark9-RNAi 1* ein spezifischer Effekt des *knockdowns* ist. Des Weiteren reicht die Überexpression der H-Isoform alleine aus um den Phänotyp zu retten.



**Abbildung 36: Überexpression von *dPark9H* rettet den *dPark9-RNAi 1*-Phänotyp.** (A) Die Kontrolle *UAS-dPark9 RNAi 1/+; Mef2-GAL4/UAS-GFP* zeigt den bereits bekannten Phänotyp der DLM. Durch die Überexpression von *dPark9H* kann der Muskelphänotyp gerettet werden: (B) *UAS-dPark9 RNAi 1/+; Mef2-GAL4/UAS-dPark9H D22.1* und (C) *UAS-dPark9 RNAi 1/UAS-dPark9H D31.1; Mef2-GAL4/+*. Anti-Phalloidininfärbung. (D) Durch die Kreuzung von *UAS-dPark9 RNAi1/+; Mef-GAL4/TM6B,gal80* zu *UAS-dPark9H D22.1* und *D31.1* schlüpfen mehr ♂-*Rescue*-Fliegen im Verhältnis zur Gesamtnachkommenschaft. P \* <sub>D22.1</sub> = 0,0217; P \* <sub>D31.1</sub> = 0,0324.

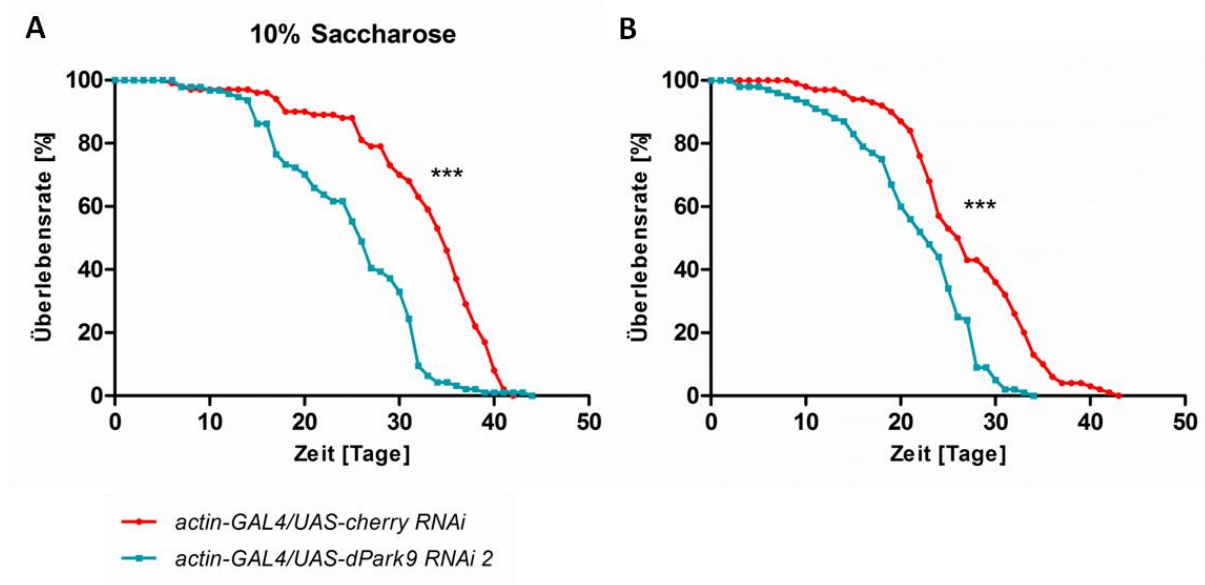
## 4.5 Funktionsanalyse

Um eine Verbindung zwischen dPark9 und der lysosomalen Funktion feststellen zu können, wurden die Fliegen diätischen Bedingungen ausgesetzt (s. 3.7.). Da nur Zucker als Nahrungsquelle zur Verfügung steht, kommt es zu einem Mangel an Aminosäuren und zur Aktivierung der Autophagie. Bei einer Beeinträchtigung der Lysosomenfunktion auf Grund eines *dPark9-knockdowns* bzw. einer *dPark9H*-Überexpression würde sich dies in einer verkürzten Lebensdauer zeigen.

### 4.5.1 Beeinträchtigung der allgemeinen Fitness und Neuronenintegrität unter diätischen Bedingungen

*DPark9*-defiziente Fliegen zeigen eine kürzere Lebensdauer als der Kontrollgenotyp *actin-GAL4/UAS-cherry RNAi* (Abbildung 37). Die *knockdown*-Fliegen weisen in Experiment A eine mittlere Lebensdauer von 26 Tagen und eine maximale von 44 Tagen auf. Im Gegensatz dazu hat die Kontrolle eine mittlere Lebensspanne von 34,5 Tagen und eine maximale von 42 Tagen. Somit ist eine Reduktion der mittleren Lebensdauer von achteinhalb Tagen (- 25%) und eine um 5% (zwei Tage) längere maximale Lebensdauer feststellbar (Abbildung 37A).

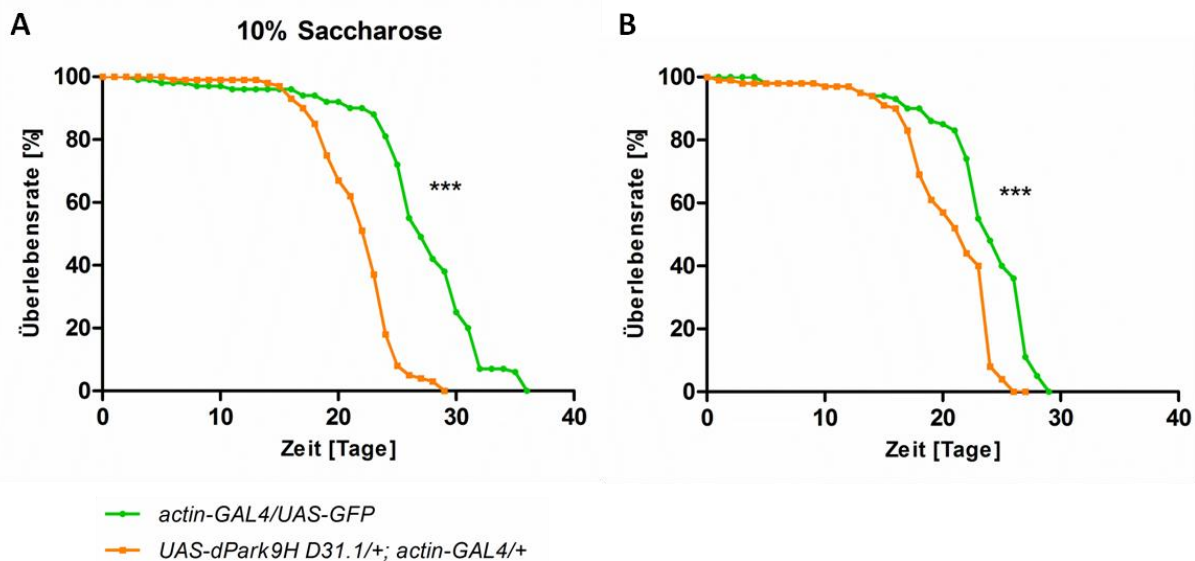
Die Wiederholung des Experiments ergibt eine mittlere Lebensspanne von 22,5 Tagen für den *knockdown* und 26 Tagen für die Kontrolle (- 13%). Die maximale Überlebensdauer der Kontrolle von 43 Tagen reduziert sich auf 34 Tagen in *dPark9*-defizienten Fliegen (- 21%) (Abbildung 37B).



**Abbildung 37: Verkürzte Lebensdauer von *dPark9*-defizienten Fliegen auf 10% Saccharose.** In Experiment A ist eine um 25% verkürzte mittlere und um 5% längere maximale Lebensspanne zu beobachten. Graph B zeigt einen Unterschied von 13% in der mittleren und 21% in der maximalen Lebensdauer. (A) LD<sub>100</sub> *cherry* = 42 Tage, LD<sub>50</sub> *cherry* = 34,5 Tage, LD<sub>100</sub> *RNAi 1* = 44 Tage, LD<sub>50</sub> *RNAi 1* = 26 Tage. (B) LD<sub>100</sub> *cherry* = 43 Tage, LD<sub>50</sub> *cherry* = 26 Tage, LD<sub>100</sub> *RNAi 1* = 34 Tage, LD<sub>50</sub> *RNAi 1* = 22,5 Tage. P \*\*\* < 0,0001.

Die Überexpression von *dPark9H* führt ebenfalls zu einer Verringerung der Lebensspanne im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 38). In Graph A lag die mittlere Lebensdauer der Überexpressionsfliegen bei 22 Tagen im Gegensatz zu 27 Tagen bei den Kontrollfliegen. Die maximale Überlebensdauer wies eine Differenz von sieben Tagen auf (36 Tage Kontrolle und 29 Tage Überexpression). Daraus ergab sich eine Reduktion der mittleren und der maximalen Lebensspanne um 19% (Abbildung 38A).

Experiment B zeigt eine Reduzierung der mittleren Lebensspanne von 23,5 auf 21,5 Tage für die Überexpression (- 9%). Die maximale Überlebensdauer der Kontrollfliegen liegt bei 29 Tagen, während die *dPark9H*-Überexpressionsfliegen nach 26 Tagen starben. Somit ist die maximale Lebensspanne um 10% kürzer (Abbildung 38B).

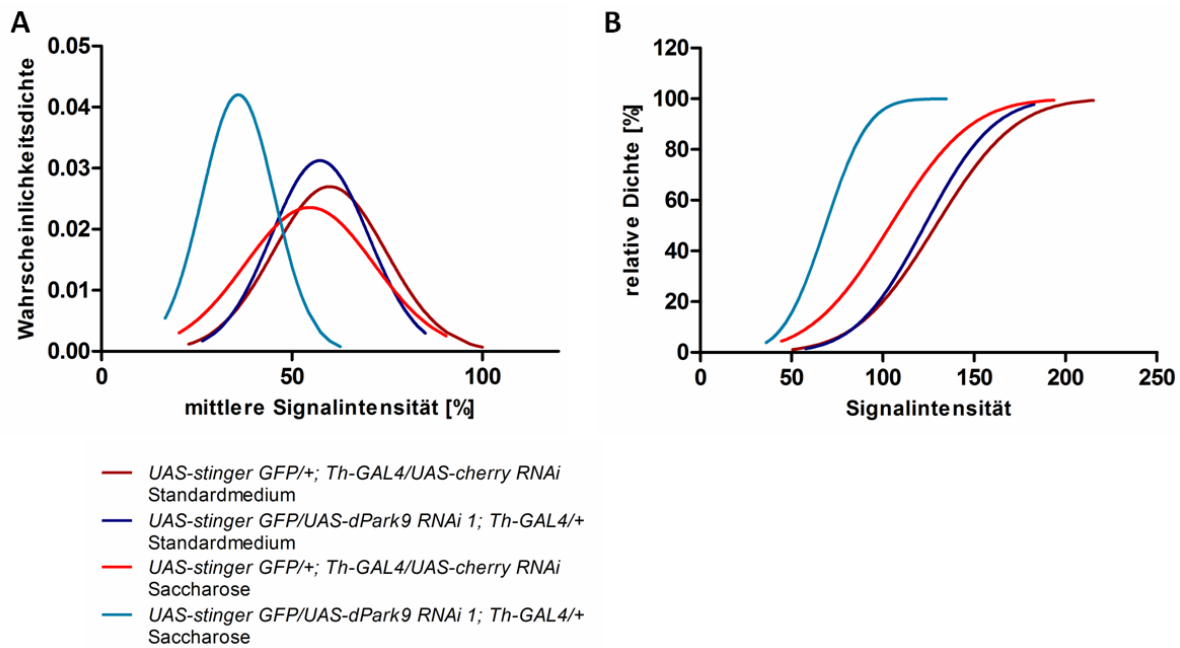


**Abbildung 38: Überexpressionsfliegen sind sensitiver auf 10% Saccharose.** Die mittlere Lebensspanne zeigt eine Reduktion um 19% (A) bzw. 9% (B) und eine Verringerung der maximalen Überlebensdauer um 19% bzw. 10%. (A) LD<sub>100</sub> GFP = 36 Tage, LD<sub>50</sub> GFP = 27 Tage, LD<sub>100</sub> D31.1 = 29 Tage, LD<sub>50</sub> D31.1 = 22 Tage. (B) LD<sub>100</sub> GFP = 29 Tage, LD<sub>50</sub> GFP = 23,5 Tage, LD<sub>100</sub> D31.1 = 26 Tage, LD<sub>50</sub> D31.1 = 21,5 Tage. P \*\*\* < 0,0001.

Bereits unter Standardbedingungen konnte eine Beeinträchtigung der dopaminergen Neuronen mittels Analyse der GFP-Signalintensität festgestellt werden (s. 4.4.6). Wie sich eine Mangelernährung auf die Integrität der dopaminergen Neuronen auswirkt, wurde im Folgenden untersucht. Dafür wurden die Kreuzungen auf Standardmedium durchgeführt und drei - fünf Tage alte Fliegen für sieben Tage unter diätischen Bedingungen inkubiert.

Unter Standardbedingungen konnte, wie schon in 4.4.6 erwähnt, kein signifikanter Unterschied zwischen jungen RNAi 1 - Fliegen und der Kontrolle festgestellt werden. Unter diätischen Bedingungen jedoch verschlechtert sich die Signalintensität vor allem bei *dPark9*-defizienten Fliegen. Der Median reduziert sich von 56,9% unter Standardbedingungen auf 31,7% auf Saccharoselösung. Die Kontrolle zeigt ebenfalls einen Unterschied im Mittelwert der Verteilung (59,8% zu 46,9%). Die kumulative Verteilung stellt diese Differenzen noch deutlicher dar (Abbildung 39).



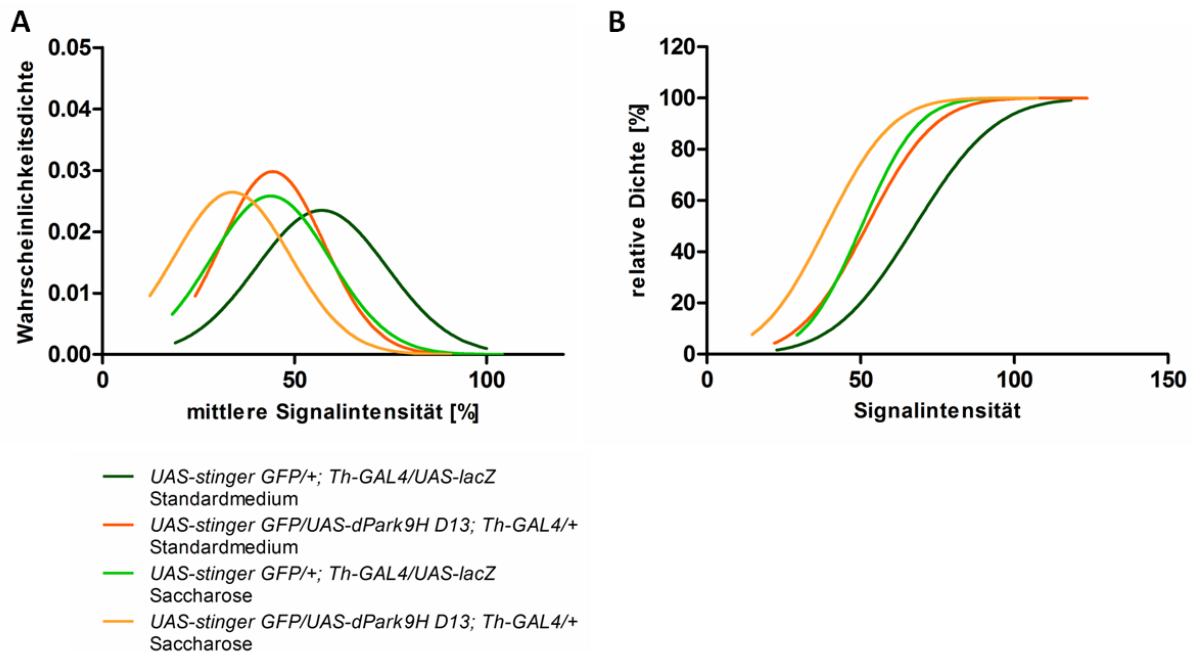


**Abbildung 39: Verschlechterung der GFP-Signalintensität nach siebentägiger Inkubation der *dPark9*-knockdown-Fliegen auf einer 10% Saccharoselösung.** (A) Die Normalverteilung der GFP-Intensität weist eine Verschlechterung für RNAi 1 - Fliegen auf. (B) Die kumulative Verteilung zeigt einen deutlichen Unterschied zwischen *dPark9*-defizienten Fliegen und der Kontrolle auf Saccharose.  $P_{NF} = 0,0186$ ;  $P_{Sac}^{****} < 0,0001$ .

Somit hat die Inkubation der Fliegen auf Saccharose einen negativen Einfluss auf die GFP-Signalintensität in allen Genotypen. Die *knockdown*-Fliegen sind von diesem Effekt stärker betroffen als die Kontrolle, was darauf hindeutet, dass *dPark9* bei der Aufrechterhaltung der Neuronenintegrität unter Mangelbedingungen eine Rolle spielt.

Die Überexpression von *dPark9H* weist schon auf Standardmedium einen signifikanten Unterschied in der Signalintensität auf (s. 4.4.6). Der Median liegt für die *UAS-stinger GFP/+; Th-GAL4/UAS-lacZ* - Fliegen bei 56,7% und für die Überexpressionsfliegen bei 41,2%. Durch die Fütterung mit 10%iger Saccharoselösung nehmen diese Werte noch weiter ab auf 43,2% (Kontrolle) und 31,6% (D13), so dass eine deutliche Verschiebung nach links erkennbar ist. Die kumulative Verteilung zeigt deutlich einen starken Effekt von Saccharose auf die Kontrolle. Die Überexpression weist keine Signalreduktion auf, was jedoch an der bereits unter Standardbedingungen starken Degeneration der Neuronen liegen kann, so dass eine weitere Beeinträchtigung sich nicht mehr so stark ausprägt (Abbildung 40).

Somit lässt sich sagen, dass die Inkubation der Überexpressionsfliegen unter diätischen Bedingungen beide Genotypen in ihrer GFP-Signalintensität beeinträchtigt.



**Abbildung 40: Inkubation auf 10% Saccharose beeinträchtigt die GFP-Intensität der dopaminergen Neuronen in *dPark9H*-überexprimierenden Fliegen und der Kontrollgruppe.** In der Normalverteilung (A) wie auch in der kumulativen Verteilung (B) ist eine Reduktion der Signalintensität sowohl für die Überexpression als auch für die Kontrolle auf Saccharose zu erkennen.  $P^{****} < 0,0001$ .

#### 4.5.2 Einfluss von Metallen auf die Lebensdauer

Obwohl die Substratspezifität von PARK9 bisher noch unbekannt ist, gibt es mehrere Hinweise, dass das Transmembranprotein an dem Transport von zweiwertigen Kationen beteiligt ist. Das Protein soll eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase in der Zelle spielen (s. 1.3.1). Um dies zu untersuchen, wurden Fliegen unter diätischen Bedingungen den Metallen Zink und Mangan ausgesetzt und deren Einfluss auf die Lebensdauer untersucht.

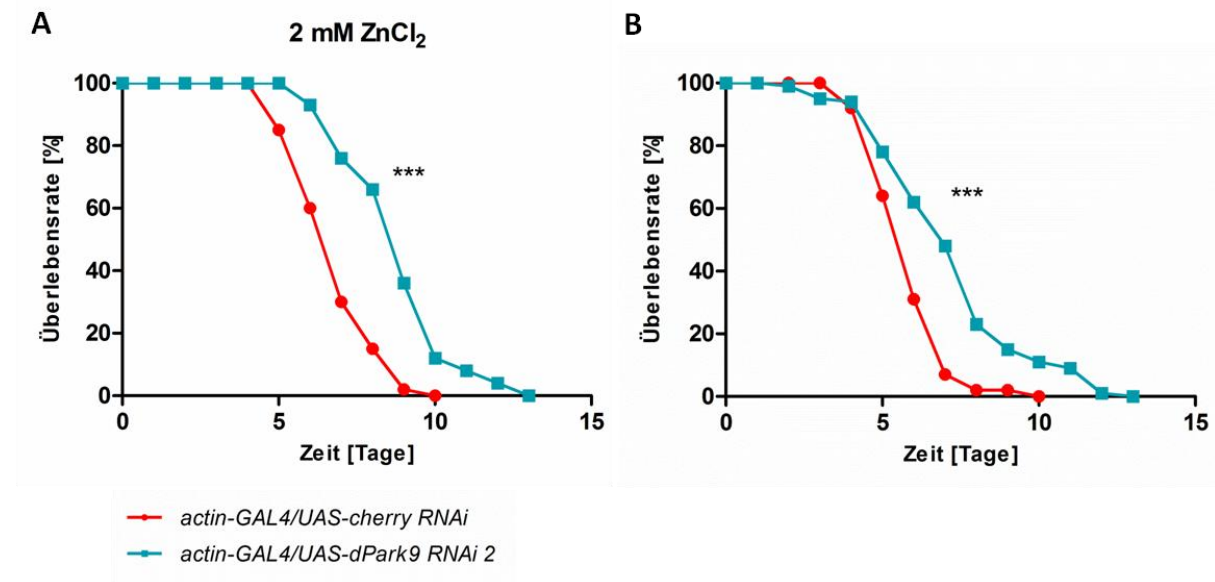
##### 4.5.2.1 Exposition gegenüber Zinkchlorid führt zu einer Verlängerung der Lebensspanne von *dPark9*-defizienten und *dPark9H*-überexprimierenden Fliegen

Die Exposition der Fliegen gegenüber 2 mM  $ZnCl_2$  stellt sich für beide Genotypen als toxisch heraus, da sich die mittlere und maximale Lebensdauer im Vergleich mit den Lebensspannen auf 10% Saccharose um mehr als 50% reduziert (Abbildung 41 und Abbildung 42).

*dPark9*-defiziente Fliegen zeigen sich weniger sensitiv auf  $ZnCl_2$  als die Kontrollfliegen. *Knockdown*-Fliegen besitzen eine mittlere Lebensdauer von achteinhalb Tagen und eine maximale von 13 Tagen. Die Kontrolle lebte im Vergleich dazu im Mittel sechs Tage und maximal zehn Tage. Das ergibt eine Verlängerung der mittleren Lebensspanne von 42% und der maximalen Überlebensdauer von 30% (Abbildung 41A).



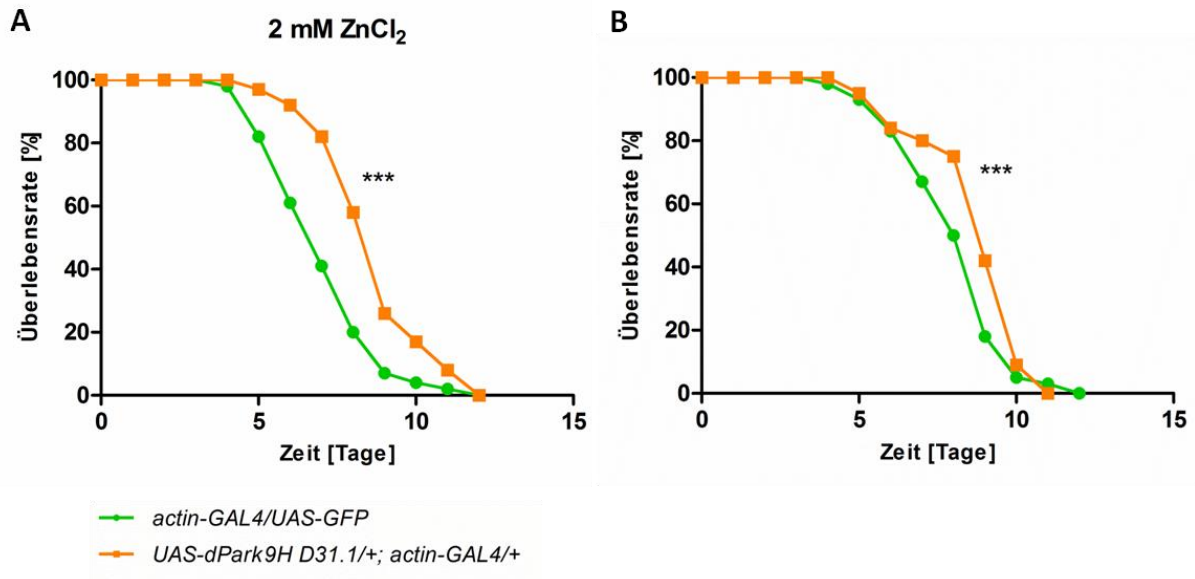
In einem zweiten unabhängigen Experiment ist eine Verlängerung der mittleren Lebensspanne von *dPark9*-defizienten Fliegen von eineinhalb Tage (+ 27%), sowie eine Differenz von drei Tagen in der maximalen Überlebensdauer (+ 30%) zu beobachten (Abbildung 41B).



**Abbildung 41: Verlängerte Lebensdauer von *dPark9*-knockdown-Fliegen auf 2 mM ZnCl<sub>2</sub> in 10% Saccharose-Lösung.** *DPark9*-defiziente Fliegen zeigen eine Verlängerung der mittleren Lebensdauer um 42% (A) bzw. 27% (B). Das zweite Experiment weist eine um 30% verlängerte maximale Lebensspanne auf. (A) LD<sub>100</sub> *cherry* = 10 Tage, LD<sub>50</sub> *cherry* = 6 Tage, LD<sub>100</sub> RNAi 1 = 13 Tage, LD<sub>50</sub> RNAi 1 = 8,5 Tage. (B) LD<sub>100</sub> *cherry* = 10 Tage, LD<sub>50</sub> *cherry* = 5,5 Tage, LD<sub>100</sub> RNAi 1 = 13 Tage, LD<sub>50</sub> RNAi 1 = 7 Tage. P \*\*\* < 0,0001.

Für die Überexpression von *dPark9H* zeichnet sich ein ähnlicher Trend wie für den *knockdown* ab. In Graph A kann von den Überexpressionsfliegen eine mittlere Lebensdauer von achteinhalb Tagen und der maximalen von zwölf Tagen detektiert werden. Die Kontrollfliegen leben maximal zwölf Tage und die mittlere Lebensspanne liegt bei sechseinhalb Tagen. Das ergibt eine Verlängerung der mittleren Lebensdauer um 32% und keinen Unterschied in der maximalen Überlebensdauer (Abbildung 42A).

In der unabhängigen Wiederholung ist der Unterschied zwischen den Kurven geringer, aber immer noch signifikant. Die mittlere Lebensspanne der Überexpression ist um einen Tag verlängert (+ 13%) während sie sich in der maximale Überlebensdauer um einen Tag verkürzt (- 8%) (Abbildung 42B).



**Abbildung 42: Die Überexpression von *dPark9H* führt zu einer Verlängerung der Lebensdauer auf 2 mM  $\text{ZnCl}_2$ .** Graph A zeigt einen Unterschied von 32% in der mittleren und keinen Unterschied in der maximalen Lebensdauer. In der Wiederholung (B) ist eine um 13% verlängerte mittlere und um 8% verkürzte maximale Lebensspanne zu beobachten (A) LD<sub>100</sub> GFP = 12 Tage, LD<sub>50</sub> GFP = 6,5 Tage, LD<sub>100</sub> D31.1 = 12 Tage, LD<sub>50</sub> D31.1 = 8,5 Tage. (B) LD<sub>100</sub> GFP = 12 Tage, LD<sub>50</sub> GFP = 8 Tage, LD<sub>100</sub> D31.1 = 11 Tage, LD<sub>50</sub> D31.1 = 9 Tage. (A)  $P^{***} < 0,0001$ ; (B)  $P^{***} = 0,0003$ .

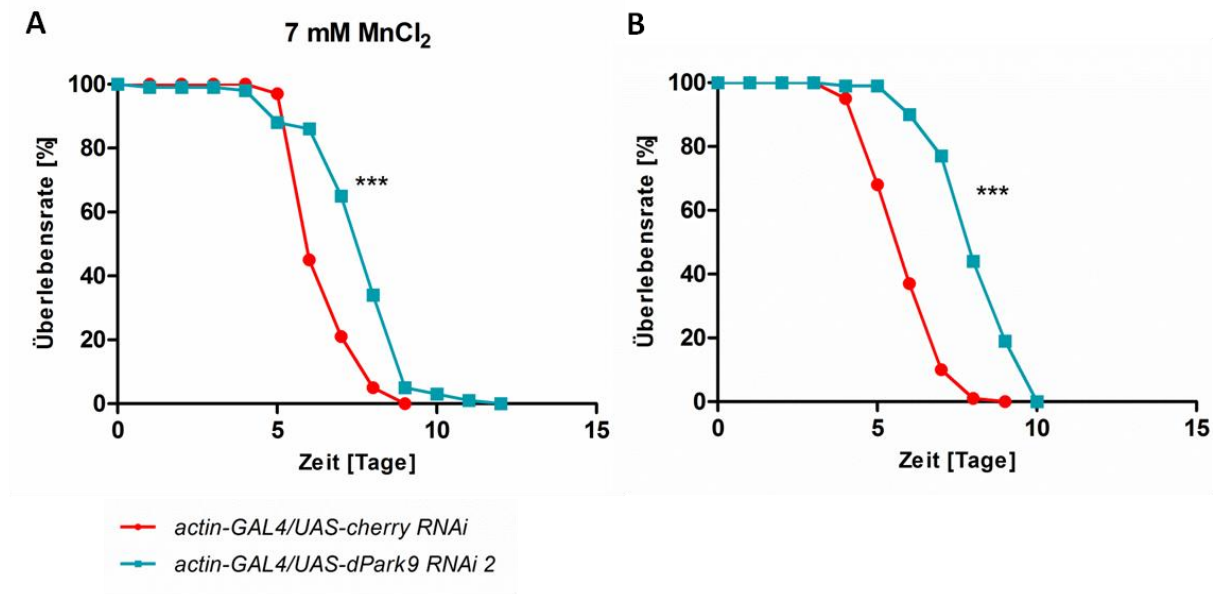
Demzufolge kann von einem schützenden Effekt des *dPark9-knockdown* auf die Lebensdauer der Fliegen geschlossen werden. Die Überexpressionslinie weist eine ähnliche Tendenz auf, ist nur weniger eindeutig. Beide Versuche zeigen, dass für die Aufrechterhaltung der Kationenhomöostase ein bestimmtes Niveau an dPark9 in der Zelle vorhanden sein muss.

#### 4.5.2.2 Positiver Einfluss von Manganchlorid auf die Lebensdauer von *dPark9*-defizienten und *dPark9H*-überexprimierenden Fliegen

Im Vergleich zu 10% Saccharose ist die Lebensdauer aller Genotypen durch die Behandlung mit 7 mM Manganchlorid reduziert (Abbildung 43 und Abbildung 44). Trotz allem zeigt sich sowohl für den *knockdown* als auch für die Überexpression ein schützender Effekt gegenüber dem Metall.

Im ersten Experiment weist die *cherry RNAi* – Kontrolle eine mittlere Lebensspanne von sechs Tagen und eine maximale Überlebensdauer von neun Tagen auf. Fliegen mit einer verminderten *dPark9*-Expression zeigen eine mittlere Lebensdauer von sieben und eine maximale von zwölf Tagen. Somit leben *dPark9*-defiziente Fliegen um 25% (mittlere Lebensdauer) und 33% (maximale Lebensdauer) länger als die Kontrollfliegen (Abbildung 43A).

In der unabhängigen Wiederholung ergibt sich eine mittlere Lebensdauer von fünf und eine maximale Lebensspanne von neun Tagen für die Kontrolle. *dPark9-knockdown*-Fliegen zeigen eine mittlere Lebensdauer von acht Tagen und eine maximale von zehn Tagen. Daraus ergab sich eine 45% längere mittlere Lebensspanne und eine 11% längere maximale Überlebensdauer (Abbildung 43B).

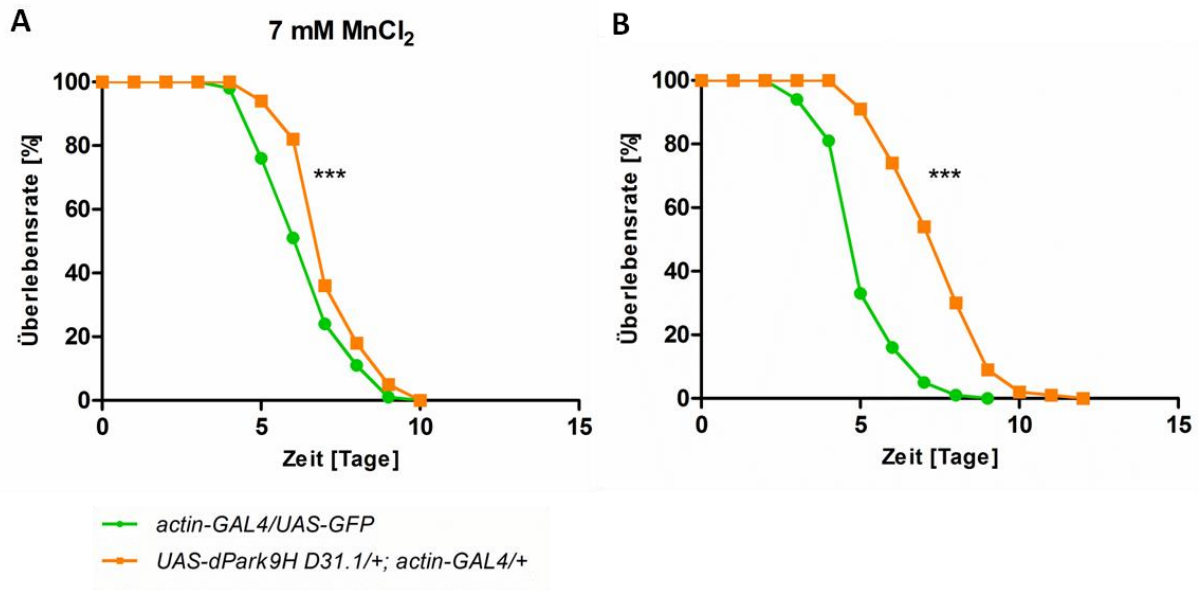


**Abbildung 43: Schützender Effekt von MnCl<sub>2</sub> für *dPark9*-defiziente Fliegen.** Graph A zeigt eine Verlängerung der mittleren Lebensdauer um 25% und der maximalen um 33% von *dPark9*-*knockdown*-Fliegen. (B) Die Wiederholung des Experiments weist eine Verlängerung der Lebensspanne um 45% (mittlere) und 11% (maximale) auf. (A) LD<sub>100</sub> *cherry* = 9 Tage, LD<sub>50</sub> *cherry* = 6 Tage, LD<sub>100</sub> RNAi 1 = 12 Tage, LD<sub>50</sub> RNAi 1 = 7,5 Tage. (B) LD<sub>100</sub> *cherry* = 9 Tage, LD<sub>50</sub> *cherry* = 5,5 Tage, LD<sub>100</sub> RNAi 1 = 10 Tage, LD<sub>50</sub> RNAi 1 = 8 Tage. P \*\*\* < 0,0001.

Die Überexpressionsfliegen zeigen eine ähnliche Reaktion auf Mangan wie die *knockdown*-Fliegen. Bei erhöhter *dPark9H*-Expression ist eine geringere Sensitivität gegenüber dem Metall zu erkennen.

In Versuch A liegt die mittlere Lebensspanne bei sechs Tagen für die Kontrolle im Vergleich zu sechseinhalb Tagen der Überexpression (+ 8%). In der maximalen Überlebensdauer gibt es keinen Unterschied (zehn Tage) (Abbildung 44A).

Das zweite Experiment zeigt einen deutlicheren schützenden Effekt: die mittlere Lebensspanne der Kontrolle liegt bei viereinhalb Tagen und die maximale Lebensdauer bei neun Tagen. Die Überexpression lebt im Mittel sieben Tage und stirbt nach zwölf Tagen. Somit ist die mittlere Lebensdauer um 56% und die maximale Lebensdauer um 33% verlängert (Abbildung 44B).



**Abbildung 44: Mangan führt zu einer längeren Lebensdauer von *dPark9H*-Überexpressionsfliegen.** (A) Beide Genotypen zeigen dieselbe maximale Lebensdauer (zehn Tage) und einen geringen Unterschied von 8% in der mittleren Lebensspanne. (B) In der Wiederholung des Experiments kann eine Differenz von 56% in der mittleren und von 33% in der maximalen Lebensdauer festgestellt werden. (A) LD<sub>100</sub> GFP = 10 Tage, LD<sub>50</sub> GFP = 6 Tage, LD<sub>100</sub> D31.1 = 10 Tage, LD<sub>50</sub> D31.1 = 6,5 Tage. (B) LD<sub>100</sub> GFP = 9 Tage, LD<sub>50</sub> GFP = 4,5 Tage, LD<sub>100</sub> D31.1 = 12 Tage, LD<sub>50</sub> D31.1 = 7 Tage. P \*\*\* < 0,0001.

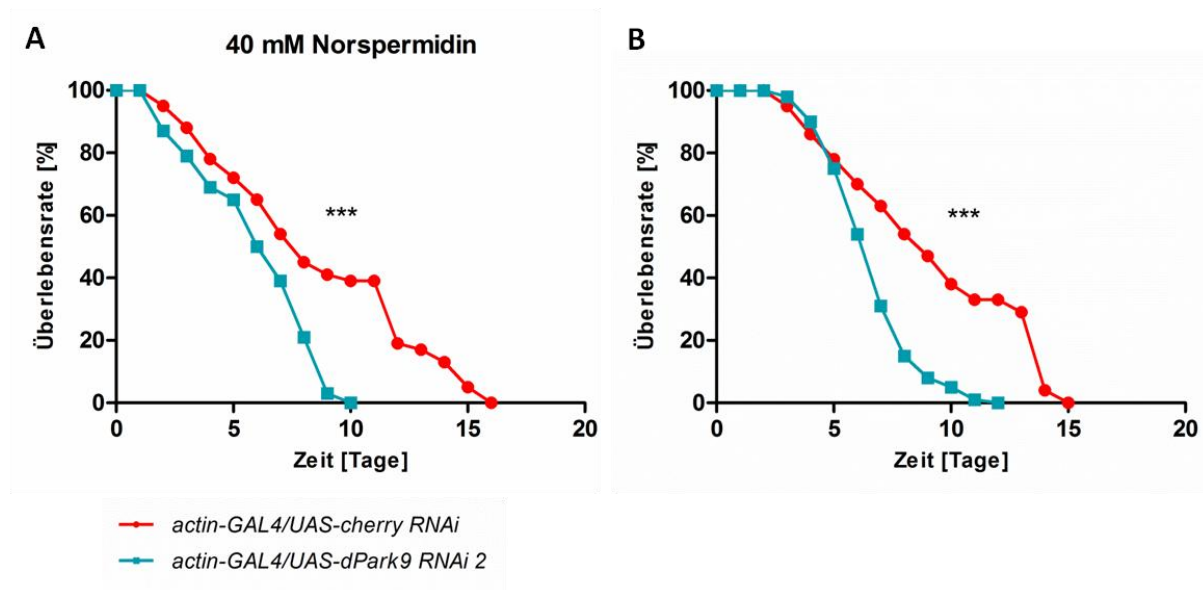
Die Exposition der Fliegen gegenüber MnCl<sub>2</sub> führt zu einer geringeren Sensitivität der *knockdown*- und Überexpressionsfliegen. Ähnlich wie bei der Exposition gegenüber Zink weisen beide Genotypen eine verlängerte Lebensspanne im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe auf. Auch hier ist die richtige Menge an dPark9 wichtig für die Regulierung des Kationentransports.

#### 4.5.3 Kein Einfluss von Norspermidin auf die Lebensdauer von *dPark9*-defizienten und *dPark9H*-überexprimierenden Fliegen

Neben dem Transport von Metallionen wurde dPark9 auch in einer Studie über Polyamintransporter in *Drosophila* beschrieben (s. 1.3.1), so dass sich eine weitere potentielle Substratklasse für das Protein eröffnet.

Die Exposition gegenüber Norspermidin ist für alle Genotypen toxisch und verkürzt die maximale Lebensdauer auf durchschnittlich 15 Tage (Abbildung 45 und Abbildung 46). Zwei unabhängige Versuche zeigen eine erhöhte Sensitivität der *dPark9*-defizienten Fliegen gegenüber Norspermidin. In Versuch A liegt die mittlere Lebensspanne bei siebeneinhalb Tagen und die maximale Überlebensdauer bei 16 Tagen für die Kontrolle. Die *knockdown*-Fliegen zeigen eine mittlere Lebensdauer von sechs Tagen und eine maximale von zehn Tagen. Somit war die mittlere Lebensdauer um 20% und die maximale um 38% reduziert (Abbildung 45A).

Experiment B zeigt eine Reduktion der mittleren Lebensdauer von achteinhalb Tage auf sechs Tage (- 29%) und der maximalen Überlebensdauer von 15 Tage auf zwölf Tage (- 20%) für *dPark9*-defiziente Fliegen (Abbildung 45B).

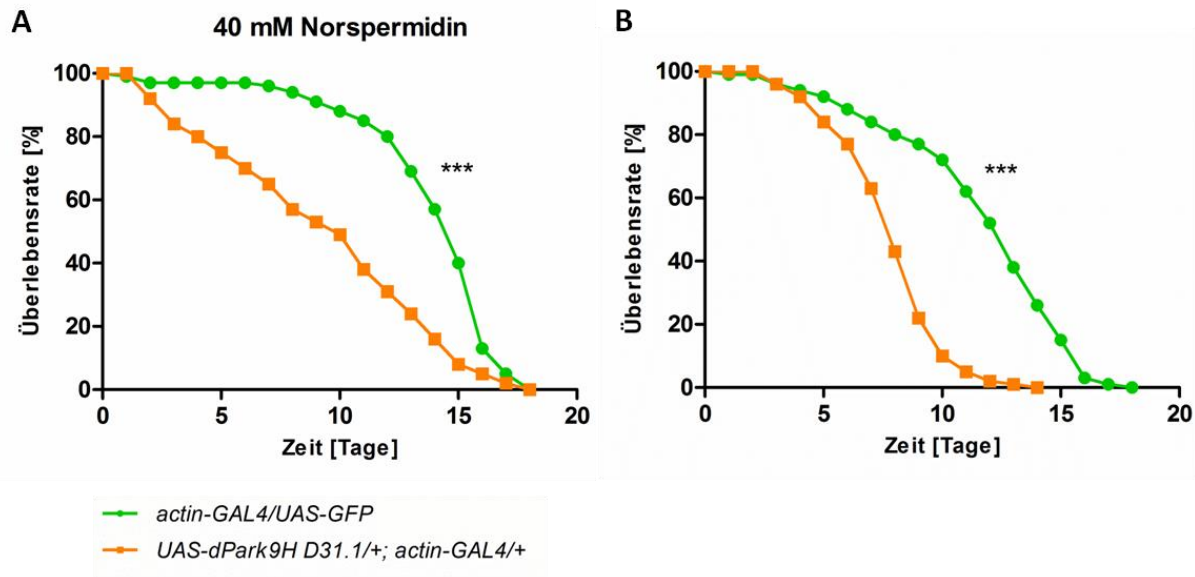


**Abbildung 45: Erhöhte Sensitivität von *dPark9*-defizienten Fliegen auf Norspermidin.** Die Kurven aus A zeigen eine Verringerung der mittleren Lebensdauer von *knockdown*-Fliegen um 20% und der maximalen um 38%. In der Wiederholung ist eine Reduktion von 20% (mittlere) und 29% (maximale) Lebensspanne zu detektieren. (A) LD<sub>100</sub> *cherry* = 16 Tage, LD<sub>50</sub> *cherry* = 7,5 Tage, LD<sub>100</sub> RNAi 1 = 10 Tage, LD<sub>50</sub> RNAi 1 = 6 Tage. (B) LD<sub>100</sub> *cherry* = 15 Tage, LD<sub>50</sub> *cherry* = 8,5 Tage, LD<sub>100</sub> RNAi 1 = 12 Tage, LD<sub>50</sub> RNAi 1 = 6 Tage. (A) P \*\*\* = 0,0004; (B) P \*\*\* < 0,0001.

Da die Inkubation auf Saccharose zu einer reduzierten Lebensdauer der *dPark9*-*knockdown*-Fliegen führt, muss dieser Faktor bei der Analyse der Norspermidinbehandlung mit einbezogen werden. Auf Saccharose ist die durchschnittliche mittlere Lebensdauer um 19% und die maximale um 13% verkürzt (s. 4.5.1). Betrachtet man nun die Werte für Norspermidin (25% und 29%) so zeigt sich ein geringer bis kein Einfluss des Polyamins. Es ist für beide Genotypen toxisch, hat aber nur einen geringen bis gar keinen Effekt auf die Unterschiede der beiden Genotypen. *DPark9*-defiziente Fliegen sind durch die verminderte Expression der P5-ATPase weder geschützter oder sensibler als die Kontrollfliegen

Fliegen mit einer erhöhten *dPark9H*-Expression zeigen eine mittlere Lebensspanne von zehn Tagen und eine maximale Lebensdauer von 18 Tagen. Die Kontrolle weist eine mittlere Lebensspanne von 14,5 Tagen und eine maximale Überlebensdauer von 18 Tagen auf. Daraus ergibt sich eine Reduktion von 31% für die mittlere Lebensdauer. Die maximale Lebensspanne beider Genotypen ist gleich (Abbildung 46A).

In der unabhängigen Wiederholung des Experiments ist ebenfalls ein Effekt des Polyamins auf die Lebensdauer zu detektieren. Die mittlere Lebensspanne reduziert sich von zwölf Tage von der Kontrolle auf sieben Tage für die Überexpression (- 42%). Die maximale Überlebensdauer ist um vier Tage von 18 auf 14 Tage verkürzt (- 22%) (Abbildung 46B).



**Abbildung 46: Verringerung der Lebensspanne von *dPark9H*-Überexpressionsfliegen durch 40 mM Norspermidin in 10% Saccharose.** Die Überexpressionsfliegen zeigen eine Reduktion der mittleren Lebensdauer von 31% (A) und 42% (B), sowie einer verkürzten maximale Lebensdauer um 22% (B) im Vergleich zur Kontrolle. (A) LD<sub>100</sub> GFP = 18 Tage, LD<sub>50</sub> GFP = 14,5 Tage, LD<sub>100</sub> D31.1 = 18 Tage, LD<sub>50</sub> D31.1 = 10 Tage. (B) LD<sub>100</sub> GFP = 18 Tage, LD<sub>50</sub> GFP = 12 Tage, LD<sub>100</sub> D31.1 = 14 Tage, LD<sub>50</sub> D31.1 = 7 Tage. P \*\*\* < 0,0001.

Die Überexpression von *dPark9H* führte ebenfalls zu einer erhöhten Suszeptibilität der Fliegen gegenüber Norspermidin im Vergleich zur Kontrolle. Auch hier müssen die Ergebnisse mit den Werten auf 10% Saccharose verglichen werden (s. 4.5.1). Da die Überexpressionsfliegen auf Saccharose bereits eine kürzere Lebensspanne aufweisen als die Kontrolle bewirkt die Exposition gegenüber Norspermidin nur eine Verkürzung der Lebensdauer beider Genotypen, verändert aber nicht das Verhältnis der beiden Genotypen zueinander. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Toxizität von Norspermidin nicht durch eine veränderte *dPark9*-Expression beeinflusst wird.

#### 4.5.4 Einfluss von Metallen und Polyaminen auf die Integrität der dopaminergen Neuronen

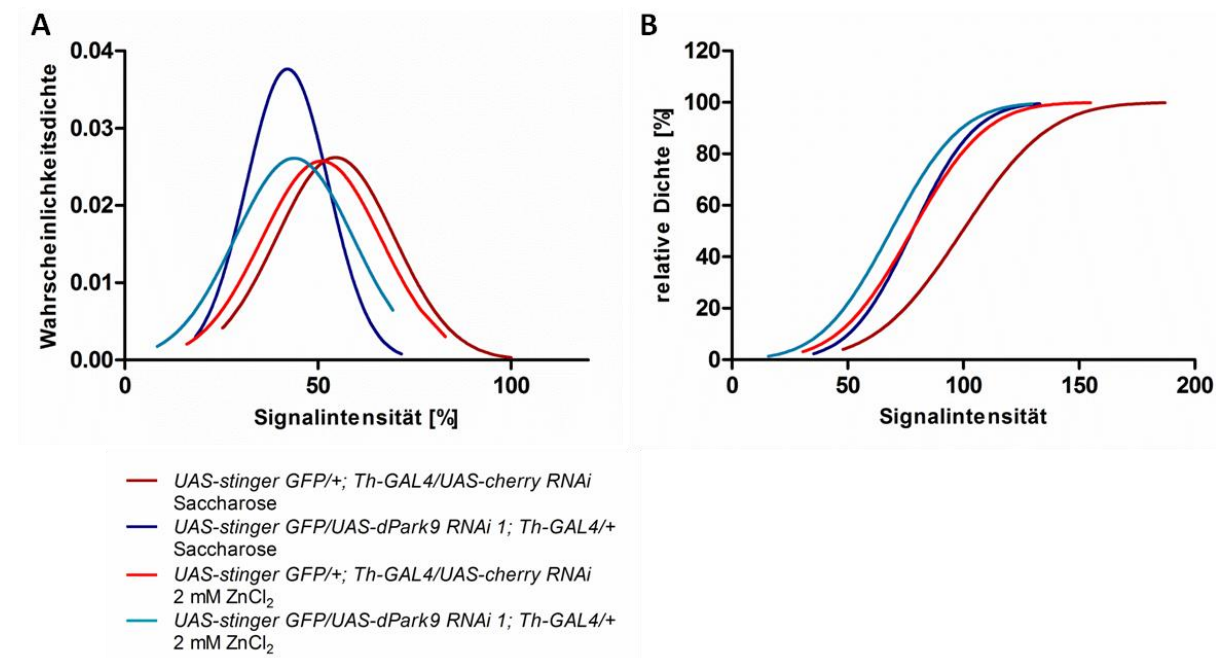
Da die Analyse der GFP-Intensität der dopaminergen Neuronen eine gute Möglichkeit darstellt, Rückschlüsse auf deren Integrität zu ziehen, wurde diese Methode verwendet um den Einfluss der potentiellen Substrate auf die Neuronen zu detektieren. Wie bereits bekannt, führt die Inkubation der Fliegen unter diätischen Bedingungen zu einer Reduktion der Signalintensität (s. 4.5.1).

##### 4.5.4.1 Kein Einfluss von ZnCl<sub>2</sub> auf die GFP-Signalintensität in dopaminergen Neuronen

Die Exposition der Kontrollfliegen *UAS-stinger GFP/+; Th-GAL4/ UAS-cherry RNAi* gegenüber einer Saccharoselösung mit 2 mM ZnCl<sub>2</sub> bewirkt eine geringe Verschlechterung der Signalintensität. Der Median der Werte reduziert sich durch die Zugabe von Zinkchlorid von 51,9% auf 40,8%.



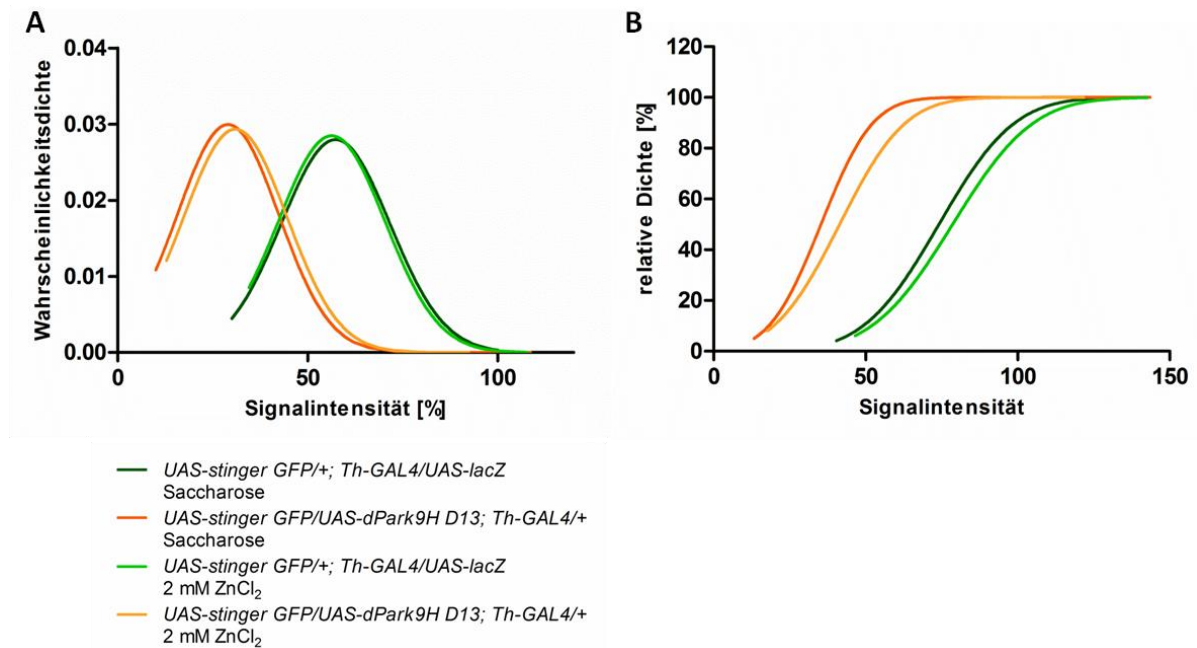
Die Werte des *knockdowns* werden durch die Exposition gegenüber  $\text{ZnCl}_2$  nur minimal beeinflusst. Der Median ändert sich von 35,0% (nur Saccharose) auf 36,7% (mit  $\text{ZnCl}_2$ ). Auf Grund der unterschiedlichen Probenanzahl ist eine Betrachtung der kumulativen Verteilung besonders wichtig. Hier zeigt sich, wenn überhaupt, ein leichter Schutz der dopaminergen Neuronen durch den *knockdown* von *dPark9* (Abbildung 47).



**Abbildung 47: Minimaler Effekt von Zink auf die GFP-Intensität *dPark9*-defizienter dopaminergen Neuronen.** (A) In der Normalverteilung der GFP-Intensität ist kein Einfluss des Metalls auf einen der beiden Genotypen feststellbar. (B) Die kumulative Verteilung zeigt einen leichten Einfluss von  $\text{ZnCl}_2$  auf *UAS-stinger* GFP/*UAS-dPark9* RNAi 1; *Th-GAL4*/+ - Fliegen.  $P_{\text{cherry}}^{****} < 0,0001$ ;  $P_{\text{RNAi 1}}^{****} < 0,0001$ .

Auf die Signalintensität der Überexpressionsfliegen hatte die Zugabe von  $\text{ZnCl}_2$  nur einen geringen Einfluss. Beide Genotypen zeigen nur minimale Veränderungen in der GFP-Intensität. Der Medianwert bleibt für beide Gruppen sehr ähnlich: Die Kontrolle weist einen Wert von 54,3% auf Saccharose und von 58,8% bei Zinkchloridzugabe auf. Der Wert für die Überexpression erhöht sich von 25,8% auf 30,3%. Die Normalverteilung zeigt in beiden Fällen sich stark überlagernde Kurven.

Da bei der Überexpression weniger Neuronen vorhanden sind als bei der Kontrolle, ist eine Betrachtung der kumulativen Verteilung besonders wichtig. Auch hier zeigt sich nur eine gering positive Beeinflussung der Signalintensität der *dPark9*-überexprimierenden Neuronen bei Zugabe des Metalls.



**Abbildung 48: Keine Beeinflussung der GFP-Signalintensität der dopaminergen Neuronen von *dPark9H*-Überexpressionsfliegen durch Zinkchlorid.** (A) Die Normalverteilung der Werte weist fast deckungsgleiche Kurven unter Saccharose- und  $ZnCl_2$ -Bedingungen auf. (B) Die kumulative Verteilung zeigt den geringen Effekt den die Zinkchloridexposition auf die Genotypen hat.  $P_{lacZ}^* < 0,0117$ ;  $P_{D13}^{****} < 0,0001$ .

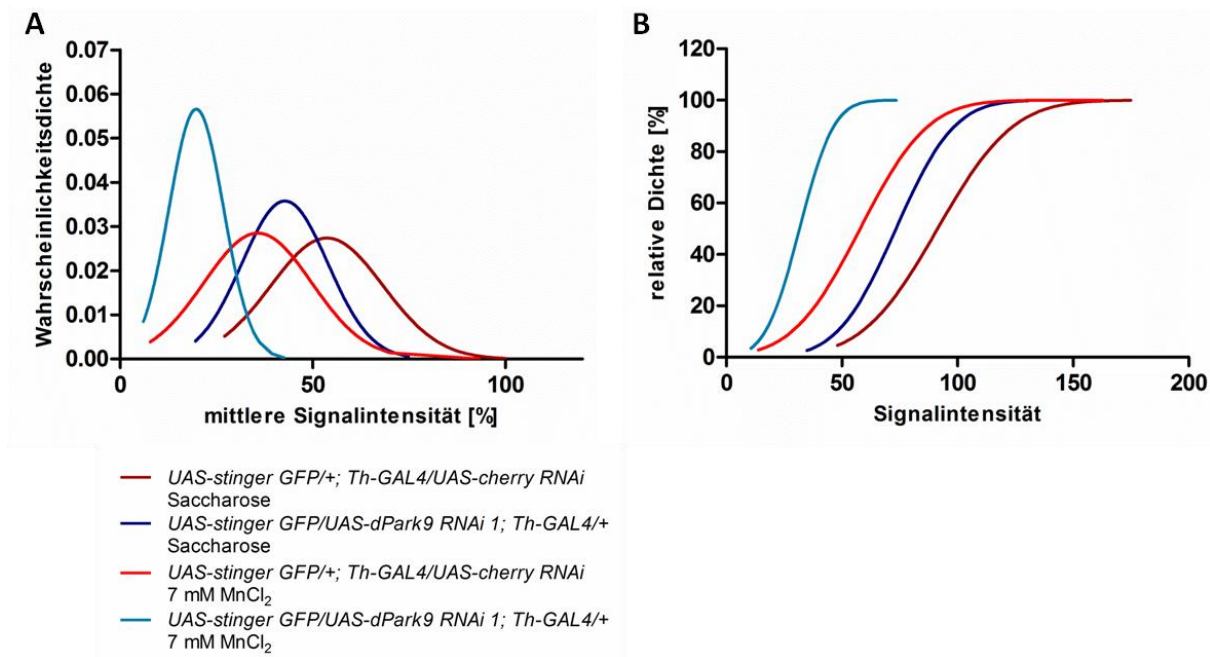
#### 4.5.4.2 $MnCl_2$ führt zu einer reduzierten GFP-Signalintensität in dopaminergen Neuronen

Fliegen, die sieben Tage lang 7 mM Manganchlorid ausgesetzt waren, zeigen eine geringere Signalintensität als die Kontrolle auf Saccharose. Der Median für die Kontrolle verschlechtert sich von 50,7% zu 33,1% unter Manganbedingungen. Bei *knockdown*-Fliegen kann eine noch deutlichere Verschiebung von 41,2% auf 18,2% festgestellt werden.

In der kumulativen Verteilung ist deutlich der stärkere Effekt von  $MnCl_2$  auf die *dPark9*-defizienten Fliegen im Vergleich zur Kontrolle zu erkennen (Abbildung 49).

Somit führt Manganchlorid zu einer Verschlechterung der Signalintensität in beiden Genotypen. Die Auswirkung auf die RNAi 1 - Fliegen ist etwas stärker als auf die Kontrolle, was auf eine erhöhte Sensibilität der dopaminergen Neuronen hinweist.

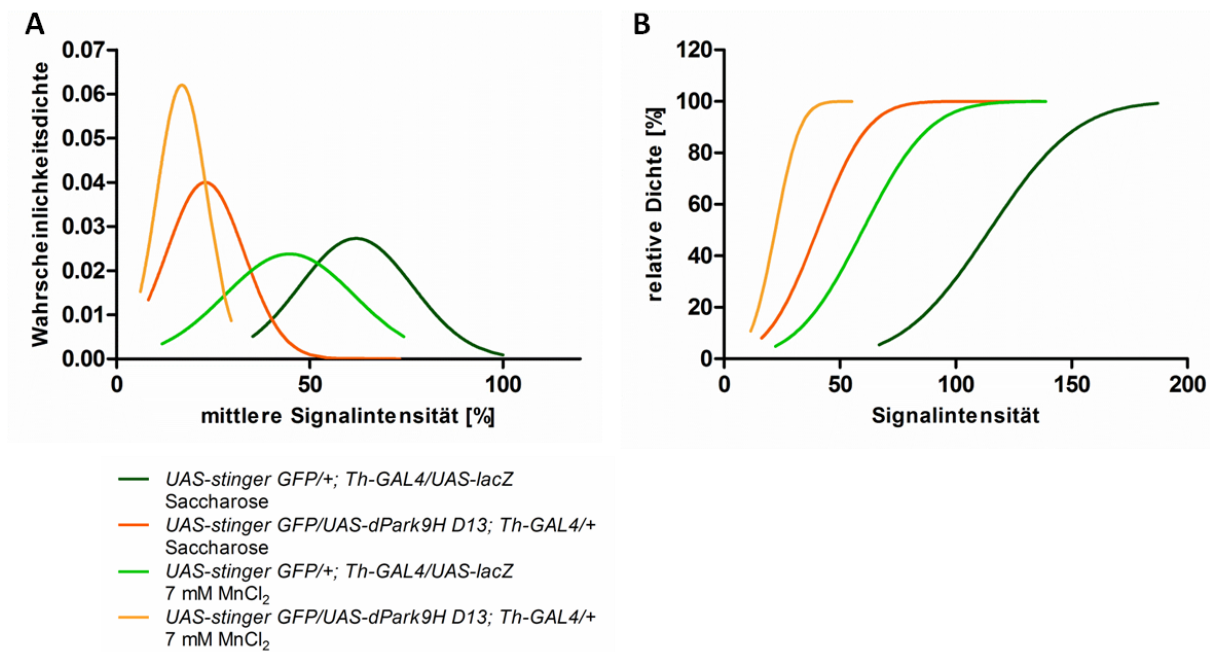




**Abbildung 49: Exposition gegenüber  $MnCl_2$  reduziert die GFP-Signalintensität in dopaminergen Neuronen von *dPark9*-knockdown-Fliegen.** (A) Die Normalverteilung weist eine 45%ige Reduktion der mittleren Signalintensität der Kurve von *dPark9*-defizienten Fliegen gegenüber der Kontrolle auf Manganchlorid auf. (B) Die Kurven der kumulativen Verteilung zeigen die starke Beeinträchtigung der Signalintensität vor allem der *knockdown*-Fliegen durch  $MnCl_2$ .  $P_{cherry}^{****} < 0,0001$ ;  $P_{RNAi 1}^{****} < 0,0001$ .

Auf die Überexpression hat Manganchlorid einen ähnlichen Effekt wie auf die *knockdown*-Fliegen. Die schon stark reduzierte Signalintensität der *UAS-stinger GFP/+; Th-GAL4/UAS-dPark9H D13* - Fliegen wird durch die Zugabe von  $MnCl_2$  noch weiter verschlechtert. Der Mittelwert der Normalverteilung sinkt von 20,8% auf 11,2%. Für die Kontrolle zeigt sich ebenfalls eine starke Beeinträchtigung der GFP-Intensität. Der Median verringert sich fast um die Hälfte von 60,7% auf 31,3%. Diese Verschlechterung der Signalintensität ist ebenfalls klar in der kumulativen Auftragung zu erkennen (Abbildung 50).

Die Zugabe von 7 mM  $MnCl_2$  zur Futterlösung führt zu einer deutlichen Verschlechterung der GFP-Signalintensität besonders bei *UAS-stinger GFP/+; Th-GAL4/UAS-lacZ*. Die Überexpressionsfliegen sind hingegen nicht so stark betroffen, was zum einen an einer geringeren Sensibilität gegenüber Mangan oder zum anderen an der bereits starken Degeneration der dopaminergen Neuronen liegen kann.

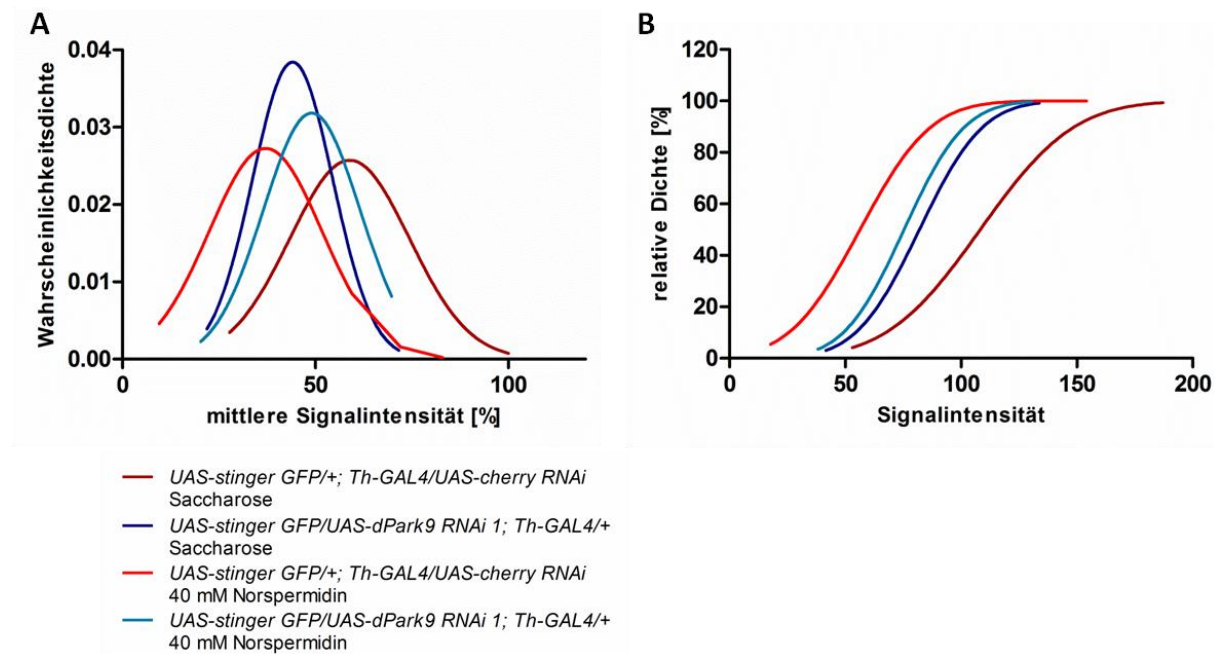


**Abbildung 50: Reduzierte GFP-Intensität durch die Überexpression von *dPark9H* unter Zugabe von 7 mM  $MnCl_2$ .** (A) In beiden Genotypen ist eine Reduktion der mittleren Signalintensität in der Normalverteilung zu erkennen. (B) Die kumulative Verteilung zeigt einen deutlich negativen Einfluss von Manganchlorid auf die Signalintensität.  $P_{lacZ}^{****} < 0,0001$ ;  $P_{D13}^{****} < 0,0001$ .

#### 4.5.4.3 Veränderte *dPark9*-Expression schützt dopaminerge Neuronen gegenüber Norspermidin

Die Exposition der Fliegen gegenüber dem toxischen Polyamin Norspermidin bewirkt eine verringerte Signalintensität der Kontrolle *RNAi cherry*. Der Median verschlechtert sich von 56,4% auf 29,7% und diese Reduktion in der Signalintensität ist in der kumulativen Verteilung deutlich zu erkennen. Der Effekt auf die *knockdown*-Fliegen ist im Vergleich dazu merklich geringer. Der Kurvenmittelwert verändert sich nur minimal von 43,4% auf 40,0%. Die Verteilfunktion zeigt dieses Ergebnis noch einmal sehr klar (Abbildung 51).

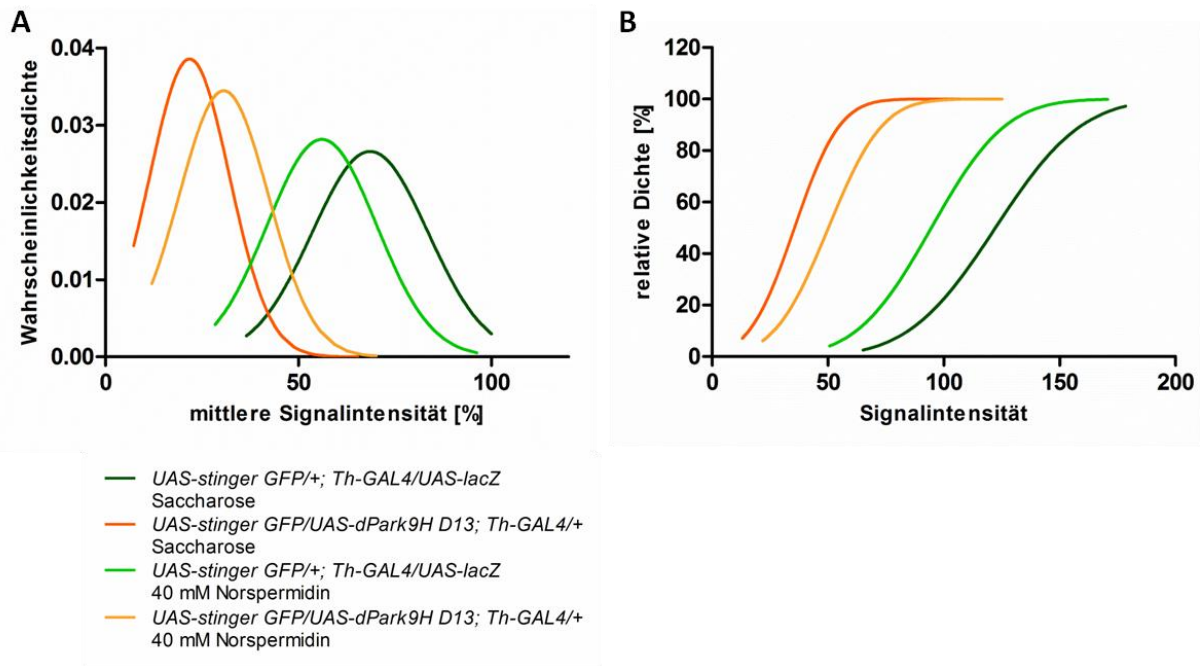
Norspermidin hat einen stark negativen Einfluss auf die Intensität von GFP in Kontrollfliegen. Der *knockdown* von *dPark9* bewirkt eine Resistenz der dopaminergen Neuronen gegenüber dem Polyamin.



**Abbildung 51: *DPark9*-defiziente dopaminerge Neuronen sind resistenter gegenüber Norspermidin.** (A) Die Kontrolle *UAS-stinger GFP/+; Th-GAL4/UAS-cherry RNAi* zeigt eine starke Beeinträchtigung durch die Inkubation mit dem Polyamin. (B) In der kumulativen Verteilung ist der geringe Effekt von Norspermidin auf die RNAi 1 - Fliegen deutlich zu erkennen.  $P_{\text{cherry}}^{****} < 0,0001$ ;  $P_{\text{RNAi 1}}^{****} < 0,0001$ .

Bei der lacZ-Kontrolle zeigt sich eine reduzierte Signalintensität unter der Exposition von Norspermidin. Der Medianwert liegt unter Saccharosebedingungen bei 69,2% und verringert sich durch Zugabe von Norspermidin auf 53,1%. Die Normalverteilung der Überexpression von *dPark9H* weist eine geringere GFP-Intensität auf als die Kontrolle. Der Medianwert liegt hier bei 18,4% unter diätischen Bedingungen. Durch die Zugabe des Polyamins zur Zuckerlösung verbessert sich dieser Wert auf 27,9%. Dies liegt immer noch deutlich unter den Werten der Kontrollen, stellt aber eine Verbesserung der Signalintensität dar (Abbildung 52).

Wie bei der *UAS-cherry RNAi* - Kontrolle hat Norspermidin auf *UAS-lacZ* ebenfalls einen negativen Einfluss auf die GFP-Signalintensität. Die Überexpression von *dPark9H* hat im Gegensatz dazu einen geringen positiven Effekt auf das GFP-Signal. Die Exposition gegenüber Norspermidin scheint sowohl in *dPark9-knockdown*- als auch in *dPark9H*-Überexpressionsfliegen eine positive Wirkung auf die Autophagie auszuüben, da sich in beiden Fällen die GFP-Intensität verbessert.



**Abbildung 52: Überexpression von *dPark9H* schützt dopaminerge Neuronen unter Norspermidinbedingungen.** (A) Die Normalverteilung zeigt eine Verschlechterung der Signalstärke bei der Kontrolle *UAS-stinger GFP/+; Th-GAL4/UAS-lacZ*. (B) In der kumulativen Verteilung lässt sich die Verbesserung der GFP-Intensität bei der Überexpressionsgruppe auf Norspermidin erkennen.  $P_{lacZ}^{****} < 0,0001$ ;  $P_{D13}^{****} < 0,0001$ .

## 4.6 Einfluss einer veränderten *dPark9*-Expression auf die Proteindegradation

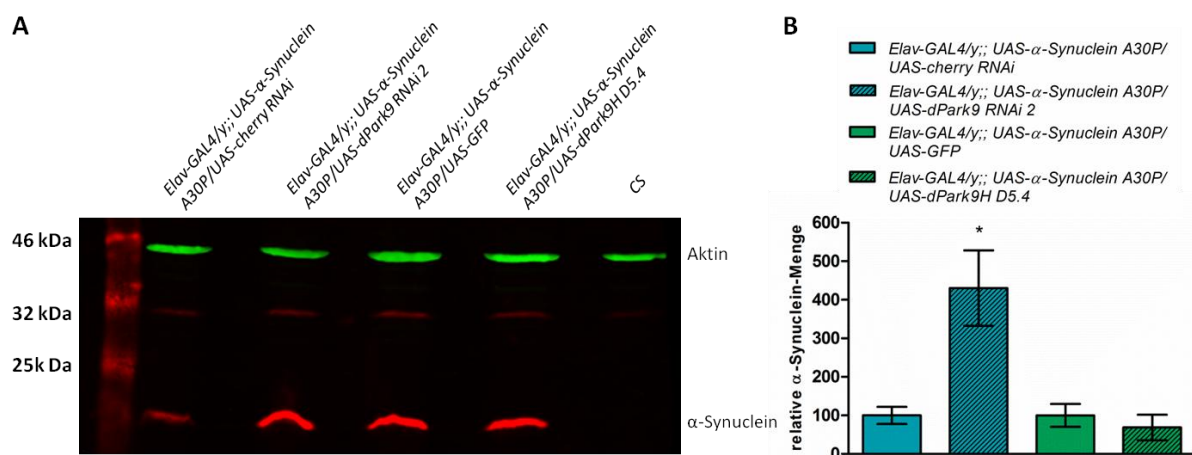
Die Lokalisation von *dPark9* konnte vor allem in den späten Endosomen und Lysosomen von S2-Zellen und im Fettkörper von *Drosophila* nachgewiesen werden (s. 4.3). Im Folgenden soll untersucht werden, ob sowohl ein *knockdown* als auch eine Überexpression von *dPark9* den lysosomalen Abbauweg sowie deren beteiligte Enzyme beeinflusst.

### 4.6.1 Beeinträchtigung der lysosomalen Abbauwege durch *dPark9*-*knockdown*

Ein Protein, das in der Parkinsonforschung schon seit langem untersucht wird, ist  $\alpha$ -Synuclein. Es ist der Hauptbestandteil von *Lewy bodies*, die im Gehirn von Parkinsonpatienten akkumulieren. Erste Zusammenhänge mit Park9 konnten bereits in verschiedenen Modelorganismen nachgewiesen werden (Gitler *et al.*, 2009). Ein Verlust von ATP13A2 in humanen Fibroblasten und in primären Mausneuronen führt zu einer Beeinträchtigung der lysosomalen Funktion und zur Akkumulation von  $\alpha$ -Synuclein (Usenovic *et al.*, 2012).

Um zu untersuchen, wie sich ein *knockdown* bzw. eine Überexpression von *dPark9* auf die Akkumulation von  $\alpha$ -Synuclein A30P in *D. melanogaster* auswirkt, wurde die Proteinmenge mittels Western Blot ermittelt (siehe 3.2).

Nach zwei Tagen Alterung zeigt sich bereits eine um 4,3 fach verstärkte Akkumulation von  $\alpha$ -Synuclein A30P in *dPark9*-*knockdown*-Fliegen im Vergleich zur Kontrolle *UAS-cherry RNAi*. Die Überexpression von *dPark9H* führt ebenfalls zu einer Akkumulation von  $\alpha$ -Synuclein, wobei zu beachten ist, dass in der Kontrolle *Elav-GAL4/y;; UAS- $\alpha$ -synuclein A30P/UAS-GFP* dieser Effekt ebenfalls zu detektieren ist, so dass in diesem Fall kein Unterschied feststellbar ist (Abbildung 53).



**Abbildung 53: Knockdown von *dPark9* führt zur Akkumulation von  $\alpha$ -Synuclein A30P.** (A) Der Western Blot zeigt eine deutliche Akkumulation von  $\alpha$ -Synuclein in *knockdown*-Fliegen. Sowohl die Überexpression von *dPark9H* als auch die Expression von GFP alleine ebenfalls führt zur Akkumulation. Als Negativkontrolle ist CS aufgetragen. (B) Im Graph ist die Akkumulation in *dPark9*-defizienten Fliegen deutlich zu erkennen. P \* = 0,0301; n= 3.



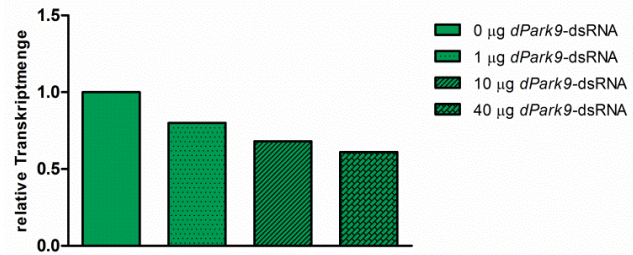
Der Einfluss des *dPark9*-knockdowns auf die  $\alpha$ -Synuclein-Menge wurde ebenfalls in S2-Zellkultur untersucht. Für die Runterregulierung der *dPark9*-Transkriptmenge wurde die Methode der dsRNA verwendet.

Bei einem Einsatz von 10  $\mu\text{g}$  *dPark9*-dsRNA kann nach zwei Tagen eine um 32% verminderte relative Transkriptmenge festgestellt werden (Abbildung 54).

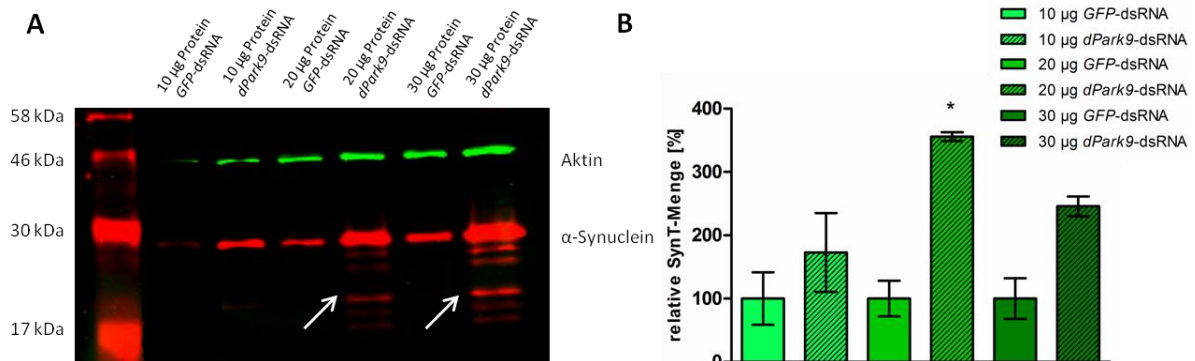
Um den Effekt eines *dPark9*-knockdowns auf die  $\alpha$ -Synucleinmenge zu untersuchen, wurden S2-Zellen zuerst mit dem Konstrukt pFSR-50-synT (Klucken *et al.*, 2007) transfiziert und dessen Expression nach zwei Tagen Inkubation induziert. Gleichzeitig wurden 10  $\mu\text{g}$  *dPark9*-dsRNA zugegeben. Nach drei weiteren Tagen fand die Proteinextraktion statt, von der unterschiedliche Mengen an Gesamtprotein geladen wurden.

In allen Spuren mit *dPark9*-dsRNA zeigt sich eine verstärkte Akkumulation von SynT im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Mit 10  $\mu\text{g}$  *dPark9*-dsRNA ist die Menge an SynT 1,7 fach erhöht. Bei der Zugabe von 20 und 30  $\mu\text{g}$  dsRNA kann nicht nur eine Akkumulation (3,6 fach und 2,5 fach) festgestellt werden, sondern auch die Bildung von Degradationsprodukten (Abbildung 55).

Durch die Western Blot Analysen wurde nachgewiesen, dass ein *knockdown* von *dPark9* in Fliegen und in S2-Zellen zur Akkumulation von  $\alpha$ -Synuclein führt (Meier, 2011).



**Abbildung 54: Bestimmung der *knockdown*-Effizienz von *dPark9*-dsRNA in S2-Zellen mittels RT-PCR.** Nach zwei Tagen ist bei einem Einsatz von 10  $\mu\text{g}$  *dPark9*-dsRNA die relative *dPark9*-Transkriptmenge um 32% reduziert (Meier, 2011).



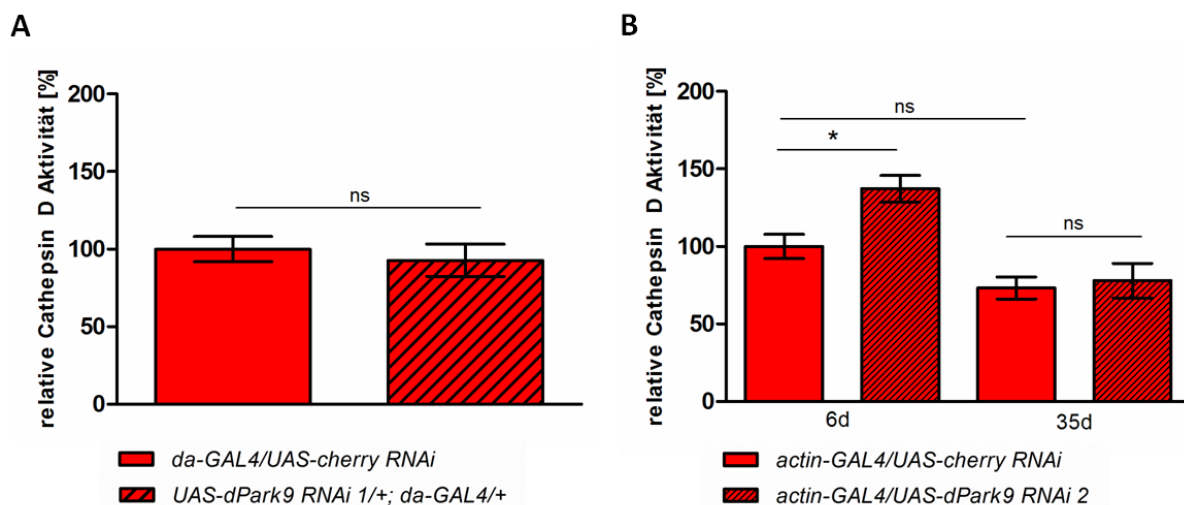
**Abbildung 55: *Knockdown* von *dPark9* in S2-Zellen führt zur Akkumulation von synT.** (A) In Spur vier (20  $\mu\text{g}$  *dPark9*-dsRNA) und sechs (30  $\mu\text{g}$  *dPark9*-dsRNA) des Western Blots sind Degradationsprodukte zu sehen (Pfeile). (B) Es ist eine bis zu 3,6 fach erhöhte SynT-Menge in *dPark9*-defizienten S2-Zellen zu detektieren  $P^* = 0,0125$  (Meier, 2011).

#### 4.6.2 Veränderte Cathepsin D-Aktivität in jungen *dPark9*-RNAi- und *dPark9H*-überexprimierenden Fliegen

Cathepsin D ist eine lysosomale Aspartatprotease und gehört zur Familie der A1 Peptidasen. Verschiedene Veröffentlichungen konnten eine Rolle des Enzyms bei der Protein-degradation, Autophagie und Apoptose nachweisen (Benes *et al.*, 2008). Für die Parkinsonforschung ist dieses Protein besonders interessant, da Cathepsin D in der Lage ist  $\alpha$ -Synuclein sehr effizient abzubauen (Sevlever *et al.*, 2008, Qiao *et al.*, 2008, Cullen *et al.*, 2009). Eine Studie konnte 2013 zudem Cathepsin D mit ATP13A2 in Verbindung bringen. Die Cathepsin D-Aktivität war in *PARK9*-knockdown-Zellen verringert ebenso wie im Modellorganismus des Medakafis. Des Weiteren zeigte sich ein Verlust an dopaminergen Neuronen und *fingerprint*-ähnliche Strukturen im Gehirn (Matsui *et al.*, 2013).

Für die Untersuchung der Cathepsin D-Aktivität wurden Larven und adulte Fliegen wie in 3.5.1 präpariert und die Enzymaktivität bestimmt. Da die starke *UAS-dPark9 RNAi 1* – Linie mit *actin-GAL4* letal ist, wurde der ubiquitäre Treiber *daughterless-GAL4* und L3-Larven verwendet. In Larven kann kein Unterschied in der Enzymaktivität festgestellt werden. Die Reduktion um 8% in *knockdown*-Larven ist statistisch nicht signifikant.

Die schwächere Responderlinie *UAS-dPark9 RNAi 2* wurde mit *actin-GAL4* gekreuzt und die Fliegen sechs und 35 Tage gealtert. In sechs Tage alten Fliegen ist ein Anstieg der Cathepsin D-Aktivität detektierbar (37%), der sich jedoch nach 35 Tagen nicht mehr nachweisen lässt. Insgesamt nimmt die Enzymaktivität in älteren Fliegen im Vergleich zu sechs Tage alten Fliegen im Durchschnitt um 25% ab (Abbildung 56).



**Abbildung 56: Die Cathepsin D-Aktivität ist in jungen *dPark9*-knockdown-Fliegen erhöht.** (A) Im L3-Stadium ist kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrolle und *dPark9*-defizienten Larven feststellbar. (B) In sechs Tage alten Fliegen zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrolle und *actin-GAL4/UAS-dPark9 RNAi 2* – Fliegen. Nach 35 Tagen ist dieser Unterschied nicht mehr detektierbar. P \* = 0,0116; ns = nicht signifikant.

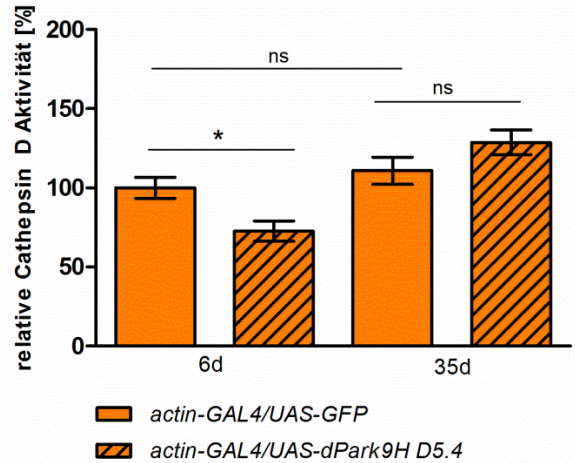


Für die Untersuchung der *dPark9H*-Überexpression wurde die Linie *D5.4* verwendet, die mit *actin-GAL4* semilethal ist. Die Fliegen wurden ebenfalls sechs und 35 Tage gealtert.

In sechs Tage alten Fliegen ist eine Reduktion der Cathepsin D-Aktivität um 27% feststellbar. Nach 35 Tagen hat sich die Aktivität in beiden Genotypen erhöht, beide sind aber nicht signifikant unterschiedlich zueinander (Abbildung 57).

Zusammenfassen kann gesagt werden, dass sich die Cathepsin D-Aktivität nur in jungen Fliegen unterscheidet. In *dPark9*-defizienten Fliegen ist die Aktivität erst erhöht (sechs Tage) um sich dann in gealterten Fliegen zu kompensieren und zu verringern.

*DPark9H*-Überexpressionsfliegen hingegen zeigen eine leichte Reduktion der Enzymaktivität in jungen Fliegen, die sich in älteren Fliegen wieder erhöht und angleicht.



**Abbildung 57: Reduktion der Cathepsin D-Aktivität in jungen Überexpressionsfliegen.** Die Enzymaktivität ist in sechs Tage alten *actin-GAL4/UAS-dPark9H D5.4* – Fliegen um 27% reduziert. Dieser Effekt ist in 35 Tage alten Fliegen nicht mehr zu detektieren.  $P^* = 0,0215$ ; ns = nicht signifikant.

## 5 Diskussion

Mutationen im humanen Gen ATP13A2 sind verantwortlich für das Kufor-Rakeb Syndrom (KRS), einer juvenilen Form von Parkinson, welche autosomal rezessiv vererbt wird und mutant homozygot oder transheterozygot auftritt. Neben den typischen Parkinsonsymptomen ist die Krankheit durch eine weitläufige Degeneration des Gehirns sowie Demenz und Spasmen gekennzeichnet (Najim al-Din *et al.*, 1994; Ramirez *et al.*, 2006).

ATP13A2 gehört zur Familie der P<sub>5B</sub>-ATPasen und wird ubiquitär exprimiert. Die stärkste Expression ist allerdings im Gehirn zu finden (Schultheis *et al.*, 2004; Møller *et al.*, 2008). Verschiedene Zellkulturstudien wiesen das Protein u.a. in den Lysosomen nach, so dass eine Rolle des Transporters in Degradationsprozessen von mehreren Arbeitsgruppen untersucht wird.

### 5.1 Das *Drosophila* Ortholog zum humanen ATP13A2 (PARK9)

Die Sequenzidentität des *Drosophila* Gens CG32000 und dem humanen ATP13A2 beträgt 37% und legt die Vermutung nahe, dass es sich um das entsprechende Ortholog handelt. Generell wird 30% Sequenzidentität als Schwellenwert für Homologie angesetzt. Rost (1999) analysierte über eine Millionen *Alignments* und zeigte, dass bei einer Sequenzidentität von unter 25% nur 10% der Paare homolog sind, während bei einer Identität von 30% oder mehr es 90% sind. Ist neben der Sequenzidentität noch eine strukturelle Ähnlichkeit vorhanden, sind beide Sequenzen mit hoher Wahrscheinlichkeit homolog (Zvelebil und Baum, 2008). Das Gen codiert für neun unterschiedlich lange Transkripte, wovon fünf (A, B, G, H und I) der ursprünglichen Genfunktion entsprechen während die vier weiteren Isoformen nur durch ein natürlich vorkommendes Transposon entstehen (s. 4.1.1). Diesen kurzen Formen fehlt die ATP-Phosphorylierungsstelle, so dass es ihnen nicht möglich ist als ATPase zu fungieren. Erste Ergebnisse zeigten nur einen geringen bis gar keinen Effekt der Überexpression einer kurzen Isoform auf die allgemeine Fitness und beeinflussen somit im Vergleich zu wildtypischen Fliegen den Metabolismus nur minimal (Dirscherl, 2014).

In *Drosophila melanogaster* existieren nur zwei P<sub>5</sub>-ATPasen: CG32000 und CG6230. Letztere gehört auf Grund der charakteristischen Sequenz PPDLP<sub>IE</sub> zur Untergruppe der P<sub>5A</sub>-ATPasen und ist das Ortholog zum humanen ATP13A1. Die Proteinsequenz von CG32000 weist nicht nur die charakteristischen ATPase-Domänen (Aktuator-, Nukleotidbinde- und, Phosphorylierungsstelle) auf (s. 1.3.1), sondern ist auch das einzige Gen in *Drosophila*, das für eine P<sub>5B</sub>-ATPase codiert. Die Sequenz für die Ionenbindestelle ist in P<sub>5B</sub>-ATPasen durch das Motiv PP(D/E)LP<sub>x</sub>E definiert und unterscheidet sich in zwei hydrophoben Aminosäuren von dem der P<sub>5A</sub>-ATPasen. Auf Grund dieses Unterschiedes in der Ladung wird vermutet, dass die Substratspezifität beeinflusst wird und die beiden Untergruppen unterschiedliche Ionen transportieren (Møller *et al.*, 2008).

Eine RNA-Seq-Analyse in Imaginalscheiben ergab, dass obwohl in *Drosophila* alle Isoformen exprimiert werden, die Formen H und G diejenigen mit der höchsten Expressionsrate sind (persönliche Mitteilung Florian Bayersdorfer). Somit kann vermutet werden, dass diesen beiden Isoformen die Hauptaufgabe zuteil wird die Funktion innerhalb der Zelle sicherzustellen.

Eine Analyse der Expression von *dPark9* in verschiedenen Entwicklungsstadien zeigt die höchsten Werte während der Embryonalphase und im späten Larven- bis frühem Puppenstadium ([www.flybase.org](http://www.flybase.org); s. Anhang Abbildung 62). Das höchste Expressionsniveau ist im zentralen Nervensystem während des Puppenstadiums zu finden, sowie in den Köpfen von ein bis 20 Tage alten Männchen (s. Anhang Abbildung 63). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Expression vor allem in den frühen Stadien von *Drosophila* auf eine Funktion in der Entwicklung schließen lässt und das Protein eine wichtige Funktion im Nervensystem ausübt.

## 5.2 Essentielle Rolle von dPark9

Nicht nur in der Expressions-, sondern auch in der Phänotypenanalyse zeigte sich die essentielle Rolle, die dPark9 für die Entwicklung spielt. Eine starke ubiquitäre Reduktion der *dPark9*-RNA-Menge (- 87%) resultierte in embryonaler Letalität, während eine gemäßigte Verminderung lebensfähig ist und sich nur in Form einer verkürzten Lebensdauer auf die allgemeine Fitness auswirkte (s. 4.4.2). Eine leichte Erhöhung der *dPark9*-Expression beeinflusste hingegen nicht die Lebensfähigkeit der Fliegen. Stärker überexprimierende Linien sind jedoch semiletal oder letal und verdeutlichen noch einmal, wie wichtig eine genau definierte Menge an dPark9 für die Entwicklung und Vitalität von *Drosophila* ist. Änderungen in der Proteinmenge scheinen die normale Zellfunktion zu beeinträchtigt, so dass wesentliche Entwicklungsvorgänge nicht bzw. nur unvollständig durchlaufen werden.

Welche Rolle das Gen speziell im Nervensystem spielt, wurde mit Hilfe der negativen Geotaxis untersucht, welche ein charakteristisches Verhalten von *Drosophila* darstellt und für die Untersuchung auf eine mögliche Dysfunktion des Nervensystems verwendet wird. Normale Fliegen zeigen eine starke geotaktische Reaktion und klettern entgegen der Erdanziehungskraft nach oben. Eine Beeinträchtigung sowohl der Lebensdauer als auch der Kletterfähigkeit wurde bereits in Analysen zur Expression von wildtypischem und mutantern *α-Synuclein* sowie bei Mutationen von *Pink* und *Parkin* in *Drosophila* festgestellt und ist ein Kennzeichen für eine neuronale Beeinträchtigung bei Parkinson (Feany und Bender, 2000; Greene *et al.*, 2003; Clark *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2006).

Sowohl *dPark9*-defiziente als auch *dPark9H*-überexprimierende Fliegen zeigten eine deutliche Verschlechterung der Kletterfähigkeit (s. 4.4.3). Dieser Rückgang der Kletterfähigkeit bereits in sieben bzw. zehn Tage alten Fliegen ist ein Hinweis auf eine Fehlfunktion im Nervensystem, hervorgerufen durch die verminderte Expression von *dPark9* respektive der vermehrten Expression von *dPark9H*. In einigen Linien führte die veränderte Expression sogar zu Semiletalität.

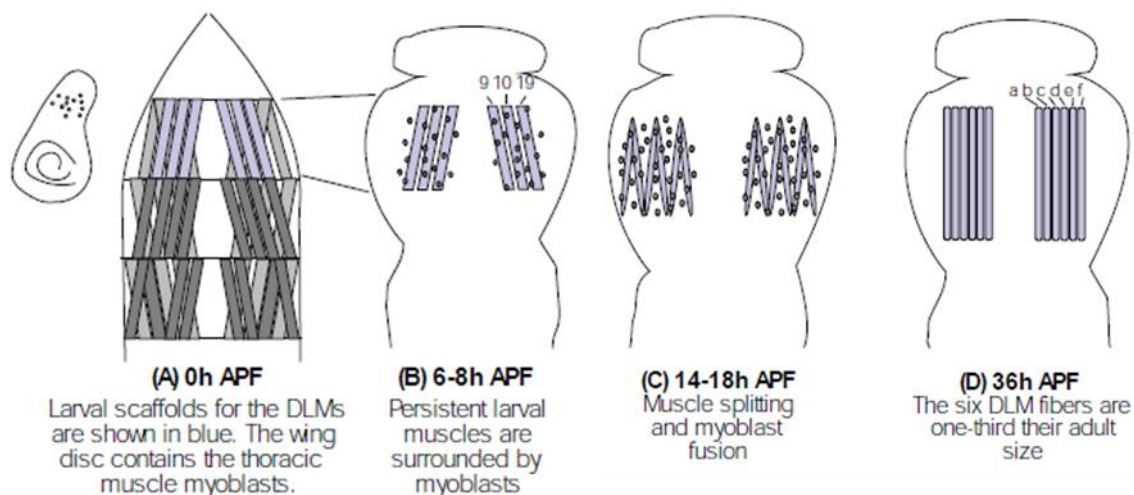
Sowohl bei RNAi- als auch bei Überexpressionsfliegen zeigte sich der stärkste Effekt vor allem bei einer ubiquitären, neuronalen oder muskulären Expression. Dies scheinen die Bereiche zu sein, die am sensitivsten auf eine Veränderung der dPark9-Menge reagieren.

### 5.3.1 Rolle von dPark9 in der Muskelentwicklung

Da die Degeneration der indirekten Flugmuskulatur (IFM) bereits in zwei anderen Parkinsongenen eine Rolle spielt (Greene *et al.*, 2003; Clark *et al.*, 2006), wurde die Auswirkung einer veränderten *dPark9*-Expression in diesem System untersucht. Die IFM von *Drosophila* lässt sich anatomisch und funktionell in zwei Gruppen unterteilen: in die dorsal longitudinalen Muskeln (DLM) und die dorsoventralen Muskeln (DVM).

In der Metamorphose werden die larvalen Muskeln, mit Ausnahme von drei Paar dorsaler Thoraxmuskeln, histolysiert (Abbildung 58). Diese Muskeln werden als *larval oblique muscle* (LOM) bezeichnet und werden später die DLM ausbilden. 8h *after puparium formation* (APF) beginnt die Vakuolisierung der LOMs, bei der sich die Sarkomerstruktur auflöst. Die Plasmamembran bleibt jedoch weiterhin bestehen.

14 h APF beginnen sich die LOMs zu teilen während gleichzeitig Myoblasten mit ihnen fusionieren. Nach 20 h ist die Teilung abgeschlossen und die DLM verlängern sich. 36 h APF haben die DLM  $\frac{1}{3}$  ihrer Gesamtlänge erreicht. Im Gegensatz zu den DLM entstehen die DVM *de novo* durch die Fusionierung von Myoblasten miteinander (Costello und Wyman, 1986; Fernandes *et al.*, 1991).



**Abbildung 58: DLM Entwicklung in *D. melanogaster*.** (A) Drei larvale Muskelfasern (LOMs, blau) dienen als Gerüst für die DLM. (B) Durch Histolyse wird der größte Teil der larvalen Muskeln abgebaut. Myoblasten lagern sich an die LOMs an. (C) Myoblasten fusionieren mit den LOMs, während diese beginnen sich zu teilen. (D) Nach 36 h APF sind sechs DLM entstanden (Fernandes und Keshishian, 1996).

Die Auswirkung einer *dPark9*-Defizienz auf die IFM wurde in null und zehn Tage alten Fliegen untersucht (s. 4.4.8). Die DLM wiesen bereits in jungen Fliegen eine veränderte Struktur der Muskelstränge auf. Im Gegensatz zu wildtypischen DLM zeigten sie eine Verdickung der Muskelansatzstellen und einer Verschmälerung in der Mitte der Muskelstränge. Die Anzahl der Stränge war nicht verändert und bestand wie beim Wildtyp (WT) aus sechs Strängen.

Da bereits in jungen Fliegen ein Phänotyp vorlag, liegt die Vermutung nahe, dass es sich hier um einen Entwicklungsphänotyp handelt. Um dies zu überprüfen, erfolgte der *knockdown* mit Hilfe des *Gal80ts*-Systems erst in adulten Fliegen. Es konnte in keinem Altersstadium eine Veränderung der DLM festgestellt werden, so dass von einem Entwicklungsphänotyp ausgegangen werden kann.

Somit beeinflusst die verringerte dPark9-Menge bereits in der Metamorphose die Entwicklung der DLM negativ. Auf Grund der vollständig vorhandenen sechs DLM-Muskelstränge in den Adulten scheint die Teilung der LOMs nur gering oder gar nicht beeinflusst zu werden. Ein interessanter Punkt ist die starke Vakuolisierung der LOMs 8 h APF. Vakuolisierung ist ein Bestandteil der Autophagie, deren Beeinträchtigung in mehreren neurodegenerativen Erkrankungen bereits beschrieben ist (Rajawat und Bossis, 2008). Möglicherweise beeinträchtigt der *knockdown* von *dPark9* die Autophagie in den LOMs und führt zu einer unvollständigen Auflösung der Myofibrillenstruktur. Die weiteren Abläufe wie die Fusion der Myoblasten mit den LOMs, die zur charakteristischen Form der DLM führen, könnten als Folge dessen gestört sein.

Die Überexpression von *dPark9H* mit *Mef2-GAL4* war in 91% der Linien letal oder semiletal (s. 4.4.1). Durch die Verwendung einer mäßig stark exprimierenden Linie und der Inkubation auf 18°C konnte die Nachkommenzahl verbessert werden. Die Analyse der DLM zeigte in dieser Linie keine Beeinträchtigung der Morphologie, so dass eine leicht erhöhte *dPark9H*-Expression die DLM nicht beeinflusst.

Die frühe und hohe Letalitätsrate in den anderen Überexpressionslinien lässt jedoch auf einen negativen Effekt in der Entwicklung schließen. Ähnlich wie in den dopaminergen Neuronen weist die Überexpression einen stärkeren Phänotyp auf als der *knockdown* (s. 4.4.5). Grund hierfür könnte der nicht 100%ige *knockdown* sein, der noch eine Restfunktionalität von dPark9 erhält. Des Weiteren exprimiert der Treiber *Mef2-GAL4* nicht nur in den Vorläuferzellen und differenzierten Zellen der somatischen und viszerale Muskulatur, sondern auch im Herz (Bour *et al.*, 1995). Eine erhöhte *dPark9H*-Expression in diesen Geweben, vor allem in letzteren, könnte die Entwicklung und Funktion beeinträchtigen und zu einer frühen Letalität führen.

Um auszuschließen, dass es sich bei dem *RNAi-dPark9*-Phänotyp um einen *off-target* Effekt handelt, wurde gleichzeitig *dPark9H* überexprimiert. Es konnte eine Wiederherstellung der wildtypischen DLM detektiert werden, sowie eine erhöhte Anzahl der Nachkommen. Damit wurde nachgewiesen, dass der Muskelphänotyp ein spezifischer Effekt des *dPark9-knockdowns* ist und die alleinige Überexpression der Isoform H ausreicht um den WT wiederherzustellen.

## 5.4 Einfluss von dPark9 auf das Entwicklungsmodell Auge

Ein weiteres Modell, das häufig für die Analyse neurodegenerativer Erkrankungen verwendet wird, ist das Komplexauge von *D. melanogaster*. Nicht nur seine leichte Manipulation, sondern auch seine sequentiellen Entwicklungsschritte erlauben das Studium von molekularen Prozessen, die an der Pathogenese einer Erkrankung beteiligten sind. So führt z.B. eine Überexpression der Parkinsongene *Pink* oder  *$\alpha$ -Synuclein* zu einem *rough* Phänotyp des Auges. Auch für Huntington oder Alzheimer sind Modelle für Interaktionsstudien entwickelt worden.

Die Expression von *UAS-dPark9H* im Auge erfolgte mittels des *gmr-GAL4*-Treibers, der in postmitotischen Zellen (hinter der morphogenetischen Furche) aktiv ist (s. 4.4.4). Während die Kontrollfliegen ein normales Komplexauge aufwiesen, zeigten die Überexpressionsfliegen Defekte in der Augenmorphologie. Dabei war eine breite Varianz in der Phänotypausprägung zu beobachten, die von einem wildtypischen Komplexauge über

mehrere Zwischenstufen bis zu apoptotischen Strukturen reichte. In Raster-EM-Aufnahmen konnte eine unregelmäßige Länge der Borsten bis hin zu deren Verlust vor allem im zentralen Bereich des Auges beobachtet werden. Des Weiteren zeigten sich Einwölbungen der Ommatidien, die eventuell von einem Verlust der Cornea verursacht wurden. In mäßigen bis starken Ausprägungen beginnt die Auflösung der Augenstruktur im Zentrum und breitet sich über das ganze Auge aus. Die Alterung von Fliegen mit leicht ausgeprägten nekrotischen Strukturen der Ommatidien führte zu einer progressiven Verschlechterung des Phänotyps.

Weder in den *knockdown*-Linien noch in anderen *dPark9H*-Überexpressionslinien konnte ein Augenphänotyp festgestellt werden. *Knockdown*-Fliegen entwickeln vermutlich auf Grund einer Restfunktion von dPark9 keinen Augenphänotyp und eine mäßige Überexpression hat keinen erkennbaren Einfluss auf die Entwicklung der Ommatidien. Die verwendete Linie D13 ist die am höchsten überexprimierende Linie und zeigt auch mit anderen Treibern immer die stärkste Phänotypausprägung. Eine Störung der Augenentwicklung ist demnach nur bei einer sehr hohen *dPark9*-Expression zu beobachten. Welche Vorgänge genau gestört werden, kann in diesem Modell nicht bestimmt werden. Möglicherweise ist der Augenphänotyp auf die starke Überexpression von dPark9H (~ 150 fach) zurückzuführen, was in einer Blockierung des ER und Golgi-Apparats und im Weiteren in einer Verschlechterung der Lysosomenfunktion resultieren könnte. Mehrere Studien wiesen die Lokalisation von humanen PARK9 in den Lysosomen nach und auch in dieser Arbeit konnte dies für das *Drosophila* Ortholog bestätigt werden (s. 4.3.2). Dass eine Beeinträchtigung der Lysosomen durch ein größten Teils neuronal exprimiertes Protein einen Augenphänotyp hervorruft, wurde schon in anderen Modellen gezeigt. So führt die Überexpression von *blue cheese* ebenfalls zu einem Verlust der Ommatidienstruktur. Das Protein wird vor allem im Nervensystem exprimiert und ist in Motoneuronen am vesikulären Transport zwischen den Nervenendigungen und den Lysosomen beteiligt (Khodosh *et al.*, 2006; Lim und Kraut, 2009).

## 5.5 Analyse von dPark9 im dopaminergen System

Charakteristisch für die Parkinsonerkrankung ist der Verlust von dopaminergen Neuronen in der *substantia nigra pars compacta* (SNc) und das Vorhandensein von Lewykörperchen und -neuriten (Bekris *et al.*, 2010).

Im Falle des KRS wurden viele Patienten mit Hilfe der Computertomographie oder mittels Magnetresonanztomographie auf dessen Auswirkungen auf das Gehirn hin untersucht. In den meisten Fällen wurde eine Atrophie des *Globus pallidus* und der Pyramiden sowie im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung des ganzen Gehirns festgestellt (Williams *et al.*, 2005; Yang und Xu, 2014). Jedoch konnte auf Grund von fehlenden histopathologischen Untersuchungen bisher nicht bewiesen werden, dass es bei dieser Parkinsonform zu einer Degeneration der dopaminergen Neuronen in der SNc kommt (Schultheis *et al.*, 2013). Da *D. melanogaster* sich schon bei der Analyse anderer Parkinsongene ( *$\alpha$ -Synuclein*, *Pink*, *Parkin*) als wertvoller Modellorganismus erwiesen hat, wurden die Folgen einer veränderten *dPark9*-Expression auf die dopaminergen Neuronen hier untersucht.

Mittels Anti-Tyrosinhydroxylase (Th)-Färbung kann die Lage und die Anzahl der dopaminergen Neuronen im *Drosophila*-Gehirn ermittelt werden. Diese sind bilateral in Gruppen angeordnet und bestehen immer aus einer definierten Anzahl an Neuronen (Nässel und Elekes, 1992). Die Gruppen innervieren bestimmte Gehirnbereiche wie z.B. die Pilzkörpern oder Unterstrukturen des Zentralkomplexes (White *et al.*, 2010). Durch die Herstellung und Verwendung eines *Th-GAL4*-Treibers ist es zudem möglich die Expression eines bestimmten Gens in den dopaminergen Neuronen zu verändern und dessen Folgen zu detektieren (Friggi-Grelín *et al.*, 2003).

Gehirn *whole mounts* von 60 Tage gealterten *dPark9*-defizienten Fliegen wurden mittels anti-Th-Färbung und Expression von kernlokalisiertem GFP auf den Verlust von dopaminergen Neuronen hin untersucht (s. 4.4.5). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der dopaminergen Neuronen von *dPark9-knockdown*- Gehirnen im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Erste Ergebnisse in anderen Tiermodellen zeigten differente Ergebnisse in Bezug auf Neurodegeneration. So konnte im Medakafisch ein Verlust von dopaminergen Neuronen in acht und zwölf Monate alten Tieren festgestellt werden. Die Anzahl der Neuronen im mittleren *Diencephalon* und in der *Medulla oblongata* waren signifikant reduziert. Auch war die Dopaminmenge in den Gehirnen von homozygoten Mutanten verringert (Matsui *et al.*, 2013). In *ATP13A2*-null mutanten Mäusen hingegen konnte kein Verlust an dopaminergen Neuronen in der *SNc* beobachtet werden. Ebenso zeigten sich keine Unterschiede im Volumen oder im Dopaminlevel der *SNc* von 20-29 Monate alten Mäusen (Schultheis *et al.*, 2013). Da sich auch bei anderen bekannten Parkinson-Orthologen die Ergebnisse hinsichtlich der Degeneration von dopaminergen Neuronen widersprechen, ist dieses Resultat nicht überraschend.

Es besteht außerdem die Möglichkeit, dass die *knockdown*-Effizienz der *UAS-dPark9 RNAi 1* - Linie nicht stark genug ist um einen Phänotyp zu erzeugen. Da selbst bei einer Reduktion der relativen Transkriptmenge um 87% immer noch funktionelles Protein vorhanden ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese geringe Menge ausreicht um die Funktion im Zellmetabolismus aufrecht zu erhalten. Selbst eine Verstärkung des *knockdowns* durch die Expression des Enzyms *Dicer* führte zu keinem Verlust an Neuronen (Blumenstock, 2012). In KRS-Patienten wird die stärkste Ausprägung der Erkrankung erreicht, wenn kein funktionelles Protein exprimiert wird. Um dies in *Drosophila* zu erreichen, wäre eine null-Mutante nötig, die jedoch nicht lebensfähig wäre, da bereits *dPark9 RNAi 1* mit *actin-GAL4* embryonal letal ist. Die Verwendung der neuen MiMIC-Linien für CG32000, bei denen verschiedene Isoformen unvollständig exprimiert werden, wäre eine mögliche Alternative um dieses Problem zu analysieren.

Im Gegensatz zu *dPark9-knockdown*-Fliegen zeigten die Überexpressionsfliegen eine Degeneration der dopaminergen Neuronen (s. 4.4.5). Da der *Th-GAL4*-Treiber bereits im Embryo und vor allem im Larven- und Puppenstadium aktiv ist ([www.flybase.org](http://www.flybase.org)), wurde untersucht, ob dieser Verlust von dopaminergen Neuronen eine Folge der Alterung ist oder bereits in der Entwicklung auftritt. Bereits in zwei Tage alten *dPark9H*-überexprimierenden Fliegen war eine verminderte Anzahl an dopaminergen Neuronen feststellbar. Dies deutet darauf hin, dass eine Überexpression bereits in der Entwicklung einen störenden Einfluss auf die Integrität der Neuronen ausübt. Nach 30 Tagen zeigten die Gehirne eine fortgeschrittene Degeneration.

Die erhöhte *dPark9*-Menge könnte die Funktion der Lysosomen negativ beeinflussen und somit zu einem Verlust der Neuronen führen. Die Möglichkeit, dass die Überexpression ab einer bestimmten Expressionsstärke die Funktion des endogenen Proteins beeinträchtigt und



sich wie ein Antimorph verhält, wurde schon mehrfach beobachtet z.B. bei der Überexpression von SPT5, SPT6 oder SPT16 (Prelich, 2012).

Die Degradation von Proteinen ist besonders für Neuronen ein wichtiger Prozess, da sie sich in einem postmitotischen Zustand befinden. Matsui *et al.* (2013) stellten im Medakafisch einen spezifischen Effekt auf die dopaminergen Neuronen fest, obwohl ATP13A2 ubiquitär exprimiert wird. Dopaminerge Neuronen enthalten durch die Autooxidation von Dopamin selbst toxische Produkte, die entfernt werden müssen. Es wird vermutet, dass die Beeinträchtigung der Lysosomenfunktion zu einer Akkumulation von toxischen Proteinen und letztendlich zum Zelltod führt.

Da in *dPark9*-defizienten Fliegen kein Verlust von Neuronen festgestellt werden konnte, wurde mit Hilfe der GFP-Signalintensität versucht, eine Beeinträchtigung der dopaminergen Neuronen festzustellen (s. 4.4.6). In einer primären Zellkultur von *Drosophila*-Neuronen, die  $\alpha$ -Synuclein exprimieren, konnte eine Reduktion der GFP-Intensität festgestellt werden. Eine Abnahme des GFP-Signals korrelierte mit dem Nachweis der Apoptose mittels Annexin V - Färbung (Park *et al.*, 2007). Die Expression von  $\alpha$ -Synuclein oder die Exposition gegenüber Rotenon genauso wie Parkinsonmutanten führten in Fliegen ebenfalls zu einer Reduktion in der GFP-Intensität im dopaminergen System, so dass eine Abnahme der Fluoreszenz mit dem Verlust an Neuronen gedeutet wurde. Einen Nachweis dieser Theorie, der die eindeutige Apoptose der Zellen oder deren Tod belegt, gibt es bis jetzt jedoch noch nicht (Botella *et al.*, 2008; Bayersdorfer *et al.*, 2010; Navarro *et al.*, 2014).

Für die Analyse wurde die Stärke der GFP-Fluoreszenz in *dPark9*-defizienten und *dPark9H*-überexprimierenden Fliegen ausgewertet (s. 4.4.6). In sieben Tage alten RNAi-Fliegen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle. Geht man davon aus, dass sich die Neuronenintegrität in der GFP-Stärke widerspiegelt, führte der *knockdown* zu keiner Beeinträchtigung der dopaminergen Neuronen. Das Fehlen einer Reduktion könnte wie oben bereits erwähnt an einem zu schwachen *dPark9*-*knockdown* oder an dem noch jungen Alter der Fliegen liegen. Tatsächlich ist in 49 Tage alten *dPark9*-defizienten Fliegen eine Verringerung des GFP-Signals zu beobachten, die eventuell auf eine gestörte Funktion der Lysosomen zurückzuführen ist.

Für die Überexpression von *dPark9H* ist bereits bekannt, dass sie zu einem Verlust von Neuronen führt (s. 4.4.5). Die verbleibenden Neuronen wiesen eine verminderte Signalintensität auf, sowie eine anormale Verteilung des nuklearen GFPs. Anstatt eines punktuellen Signals ist dieses diffus im Cytoplasma verteilt. Eventuell ist dies ebenfalls ein Anzeichen für eine Beeinträchtigung der Neuronenintegrität.

Da, wie bereits erwähnt, unter Mangelbedingungen die Autophagie aktiviert wird, ist eine Funktion von dPark9 im lysosomalen Abbauweg wahrscheinlich. Unter diätischen Bedingungen zeigte sich in *dPark9*-defizienten Fliegen eine Reduktion der GFP-Intensität in den Neuronen (s. 4.5.1). Die Überexpression von *dPark9H* führte ebenfalls zu einer Reduktion des GFP-Signals. Im Vergleich zur Kontrolle war dies jedoch nicht so stark ausgeprägt, so dass wenn überhaupt von einem leicht schützenden Effekt gesprochen werden kann. Da die Degeneration der dopaminergen Neuronen unter Standardbedingungen bereits deutlich fortgeschritten ist, ist es außerdem möglich, dass eine weitere Beeinträchtigung sich nicht mehr so stark ausprägt.

## 5.6 Molekulare und zelluläre Funktion von dPark9

### 5.6.1 DPark9 ist in den Lysosomen lokalisiert

Durch die Bestimmung der Lokalisation eines Proteins lassen sich Rückschlüsse auf dessen Funktion ziehen. Für die intrazelluläre Lokalisation der *Drosophila* Orthologe dPark9H und dPark9G wurden diese mit GFP fusioniert und die Konstrukte in S2-Zellen exprimiert (s. 4.3.1). Die beiden Proteinisoformen konnten in Vesikeln detektiert werden, die zum Teil mit dem Marker LysoTracker kolokalisierten. Dieser färbt spezifisch nur saure Organellen (späte Endosomen und Lysosomen) die einen pH-Wert zwischen 4,5 und 5,5 besitzen (Sorkin und von Zastrow, 2002). Einzelne Vesikel zeigten keine Doppelfärbung, sondern nur ein GFP-Signal, so dass es sich hier möglicherweise um frühe Endosomen handelt (pH 6,0-6,5). Trotz einer unterschiedlichen Sequenz am N-Terminus ist die Lokalisation der beiden Isoformen dieselbe.

In der Fruchtfliege eignet sich vor allem der Fettkörper besonders gut um Lysosomen zu markieren und deren Bildung anzuregen. Neben der Größe des Organs und dessen leichter Zugänglichkeit, kann durch Nahrungsentzug in Larven schnell eine Autophagieantwort ausgelöst werden (Scott *et al.*, 2004). Die Expression von dPark9H-GFP im Fettkörper zeigte ebenfalls eine Kolokalisation mit dem LysoTracker. Wie in S2-Zellen war das Protein in der Membran von späten Endosomen und Lysosomen zu finden. Auch hier zeigten einige Vesikel keine Kolokalisation mit dem Marker, bei denen es sich eventuell um frühe Endosomen handelt. Zusätzlich konnte es noch in der Zellmembran detektiert werden.

Das humane ATP13A2 konnte bereits in verschiedenen Zellkulturstudien im Lysosom nachgewiesen werden. So zeigte Ramirez *et al.* (2006), dass in COS7-Zellen exprimiertes V5-markiertes wildtypisches ATP13A2 mit den lysosomalen Membranproteinen Lamp1 und Lamp2 kolokalisiert. Ebenso war eine Übereinstimmung eines GFP-getaggten PARK9 mit einem lysosomalen Marker zu detektieren. 2011 wurden diese Ergebnisse von drei weiteren Arbeitsgruppen bestätigt, die in verschiedenen Zellkulturmodellen (HEK293, N2a, Hela und primäre Neuronen von Ratten) die exogene Expression von ATP13A2 in den Lysosomen nachwiesen (Park *et al.*, 2011; Tan *et al.*, 2011; Ugolino *et al.*, 2011).

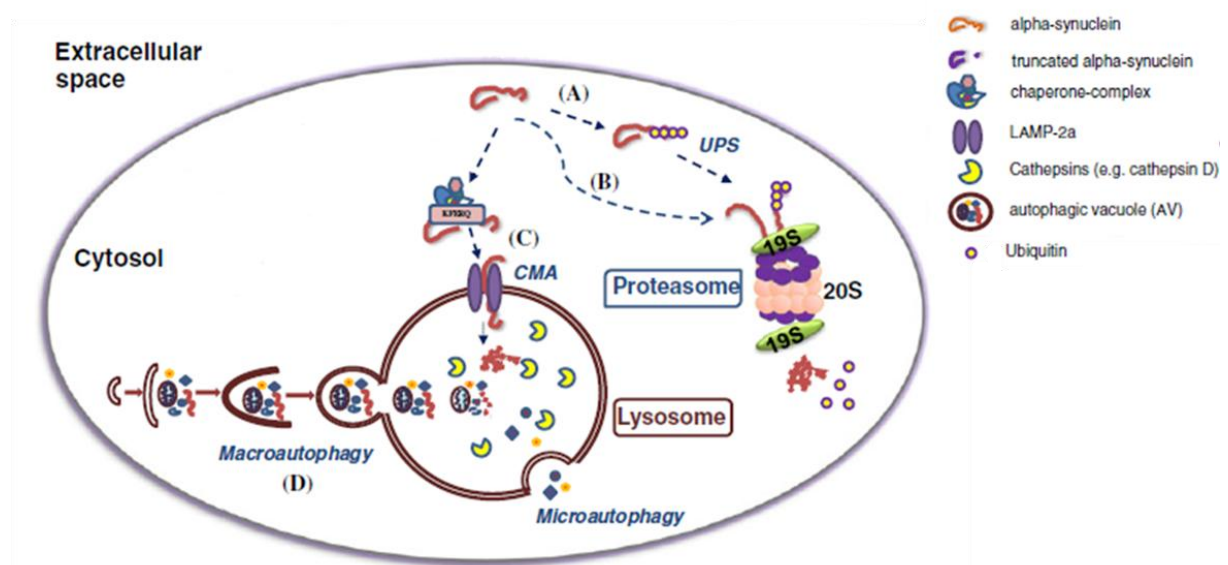
Die Lokalisation von endogenem ATP13A2 wurde ebenfalls zusammen mit dem Marker Lamp1 in SH-SY5S-Zellen gefunden (Tan *et al.*, 2011). Des Weiteren konnte das Protein auch in frühen und späten Endosomen sowie in geringem Maße in Autophagosomen und dem Golgi-Apparat detektiert werden (Ramonet *et al.*, 2012; Matsui *et al.*, 2013). Neben der Bestimmung des humanen Proteins konnte auch dessen Ortholog in *S. cerevisiae* in der Vakuole gefunden werden, dem Äquivalent zu den Lysosomen (Gitler *et al.*, 2009).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass auch dPark9 in den Lysosomen und dazugehörigen Vesikeln lokalisiert ist und die Annahme weiter unterstützt, dass es sich hier um das Ortholog zu ATP13A2 handelt. Das Vorhandensein in der Zellmembran der Fettkörperzellen könnte ein Artefakt auf Grund der starken Überexpression von dPark9H sein.

### 5.6.2 Knockdown von dPark9 führt zur Akkumulation von $\alpha$ -Synuclein

Eines der Merkmale von neurodegenerativen Erkrankungen ist die Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen. Eine Beeinträchtigung des Ubiquitin-Proteasom Systems (UPS) durch Mutationen in *Pink*, *Parkin*, *UCH-L1* und  *$\alpha$ -Synuclein* ist in mehreren Studien beschrieben. Während *Pink* und *Parkin* hauptsächlich die Degradation von defekten und alten Mitochondrien mittels Mitophagie induzieren, ist *UCH-L1* ein deubiquitinierendes Enzym (DUB) und für das Recycling von Ubiquitinmolekülen zuständig.

$\alpha$ -Synuclein ist an der Bewegung von Vesikeln beteiligt und dessen Aggregate sind der Hauptbestandteil von Lewy-Körperchen, die ein Charakteristikum für Parkinson darstellen. Die Expression von mutanten Formen (A30P, A53T, E46K) oder Genmultiplikationen von  $\alpha$ -Synuclein verstärken diesen Effekt weiter (Conway *et al.*, 2000; Singleton *et al.*, 2003). In den Proteinaggregaten ist neben  $\alpha$ -Synuclein auch Ubiquitin zu finden und deutet auf einen Abbau über das UPS hin. Die Inhibition des Proteasoms von WT- und A53T- exprimierenden SH-SY5S-Zellen bewirkte einen verlangsamten Abbau von  $\alpha$ -Synuclein und führten zur Schlussfolgerung eines proteasomalen Abbaus (Bennett *et al.*, 1999). Mittlerweile zeigen verschiedene Studien, dass auch die Autophagie beim Abbau eine Rolle spielt (Abbildung 59). Sowohl Webb *et al.* (2003) als auch Cuervo *et al.* (2004) konnten nachweisen, dass sowohl wildtypisches  $\alpha$ -Synuclein als auch Mutanten über die Chaperon-vermittelte Autophagie degradiert werden. Jedoch blockieren die mutanten Formen die Aufnahme über den Rezeptor und die weiteren Schritte. Eine Verstärkung der Makroautophagie durch die Expression von Beclin-1 oder aktivierende Substanzen bewirkte eine verminderte Menge an  $\alpha$ -Synuclein in Zellkultur und im Mausmodell (Spencer *et al.*, 2009).



**Abbildung 59: Abbauwege von  $\alpha$ -Synuclein.** Neben dem Ubiquitin-abhängigen Abbauweg (A) kann  $\alpha$ -Synuclein auch über einen unabhängigen Weg (B) durch das Proteasom abgebaut werden (WT und Mutanten). Sowohl die Chaperon-vermittelte Autophagie (CMA) als auch die Makroautophagie spielen beim Abbau dieses Proteins eine Rolle. CMA kann wildtypisches  $\alpha$ -Synuclein abbauen, während durch die Makroautophagie unterschiedliche Formen degradiert werden (abgeändert nach Xilouri *et al.*, 2013).

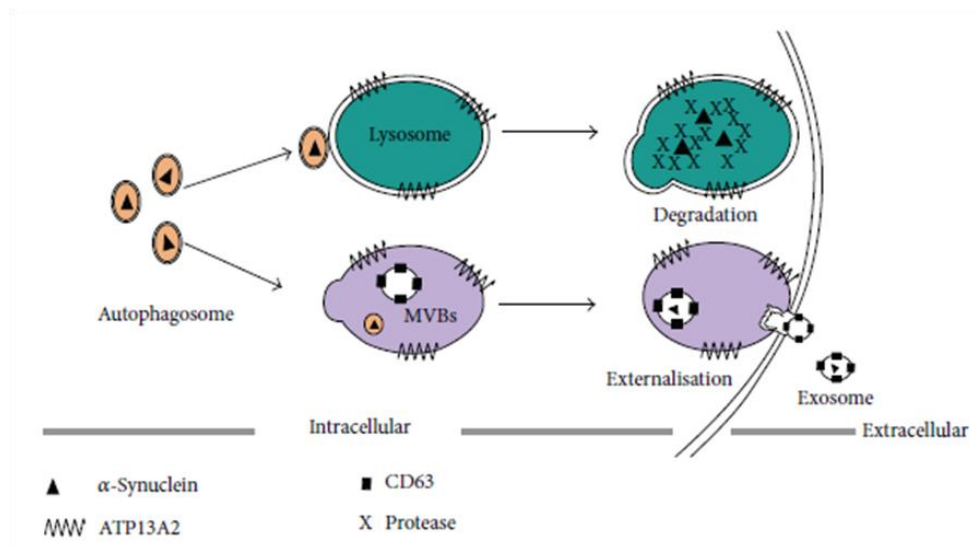
Mittels Western Blot Analyse konnte gezeigt werden, dass der *knockdown* von *dPark9* zur Akkumulation von A30P in *Drosophila* führt (s. 4.6.1). Die relative  $\alpha$ -Synuclein-Proteinmenge war in *dPark9*-defizienten Fliegen um das 4,3 fache erhöht. Die Auswirkung einer verringerten *dPark9*-Expression auf  $\alpha$ -Synuclein wurde zusätzlich in S2-Zellkultur untersucht. Die Menge an  $\alpha$ -Synuclein erhöhte sich um das 3,6 fache und zeigte zusätzlich mehrere Banden von Degradationsprodukten (Meier, 2011). Dieses Experiment zeigt, dass ein *knockdown* von *dPark9* die Funktion der Lysosomen beeinträchtigt und damit zu einer verstärkten Akkumulation von  $\alpha$ -Synuclein in der Zelle führt.

Dies ist in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Usenovic *et al.* (2012), die in primären Kortikalneuronen von Mäusen und in humanen Fibroblasten von KRS-Patienten zeigten, dass der Verlust von *ATP13A2* zu einer Beeinträchtigung der lysosomalen Funktion und zu einer verstärkten Akkumulation von  $\alpha$ -Synuclein führt. Dieser toxische Effekt einer *ATP13A2*-Defizienz wird durch die reduzierte Aktivität der Lysosomen und dem Vorhandensein von endogenem  $\alpha$ -Synuclein bestimmt. Im *C. elegans* Model resultierte der Verlust von *ATP13A2* ebenfalls in einer verstärkten Ansammlung von  $\alpha$ -Synuclein in *body wall* Muskeln (Hamamichi *et al.*, 2008). In einem *ATP13A2-knockout*-Mausmodell konnte zum ersten Mal *in vivo* nachgewiesen werden, dass der Verlust der ATPase zu einer Akkumulation von unlöslichem  $\alpha$ -Synuclein im Hippocampus führt (Schultheis *et al.*, 2013).

Die Überexpression von *dPark9H* in *Drosophila* wies keinen Unterschied in der Akkumulationsmenge von  $\alpha$ -Synuclein im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle auf. Vergleicht man jedoch die *GFP*-Kontrolle der Überexpression mit der *cherry*-Kontrolle des *knockdowns* so ist eine vermehrte  $\alpha$ -Synucleinmenge in der Überexpressionskontrolle zu detektieren. Möglicherweise führt die Expression von A30P und *GFP* in Kombination bereits zu einer Beeinträchtigung der Abbauwege. Die Verwendung einer anderen Kontroll-UAS-Linie z.B. *lacZ* könnte eine Alternative darstellen.

Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu einigen Publikationen, die einen positiven Effekt der Überexpression auf die  $\alpha$ -Synucleinmenge beschreiben. So verhindert die *ATP13A2*-Überexpression in *S. cerevisiae*, *C. elegans* und primärer neuronaler Zellkultur die Aggregation von  $\alpha$ -Synuclein und die dadurch ausgelöste Toxizität (Gitler *et al.*, 2009).

Eine erhöhte Expression von *ATP13A2* in SHSY-5Y-Zellen führte zu einer um 60% verringerten intrazellulären Menge an  $\alpha$ -Synuclein als in der Kontrolle. Überraschenderweise nicht durch lysosomalen Abbau, sondern durch Fusionierung der *multivesicular bodies* (MVB) mit der Plasmamembran und Abgabe von  $\alpha$ -Synuclein in den extrazellulären Raum (Kong *et al.*, 2014; Abbildung 60).



**Abbildung 60: Beteiligung von ATP13A2 am Abbau von  $\alpha$ -Synuclein.** Nachdem  $\alpha$ -Synuclein von Autophagosomen umschlossen wurde, können diese entweder mit Lysosomen fusionieren oder über MVBs aus der Zelle geschleust werden. In beiden Fällen wird ATP13A2 in der Membran benötigt (Yang und Xu, 2014).

### 5.5.3 Auswirkungen einer veränderten *dPark9*-Expression auf die Cathepsin D-Aktivität

Eines der am häufigsten vorkommenden lysosomalen Enzyme ist Cathepsin D, das in vielen Bereichen des Gehirns wie Hippocampus, Cortex und den dopaminergen Neuronen der SNc exprimiert wird (Whitaker *et al.*, 1981). Es ist verantwortlich für den Abbau langlebiger Proteine, Aktivierung von Wachstumsfaktoren und Hormonen, Enzymvorläufern sowie Regulierung der Apoptose. Ein Verlust von Cathepsin D führt zu einer verminderten Funktion des Autophagie-lysosomalen Abbauwegs und zur Entstehung von neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen (NCLs), die durch Neurodegeneration, Sehverlust und Epilepsie gekennzeichnet sind (Koike *et al.*, 2000; Benes *et al.*, 2008).

Die Analyse der Cathepsin D-Aktivität erfolgte sowohl in *dPark9*-defizienten - als auch in überexprimierenden Fliegen unterschiedlichen Alters. In sechs Tage alten *dPark9*-*knockdown*-Fliegen zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Enzymaktivität. Der leichte Anstieg der Cathepsin D-Aktivität in jungen *dPark9*-defizienten Fliegen könnte auf eine Kompensation einer verringerten Lysosomenfunktion hindeuten, die durch die reduzierte *dPark9*-Menge entsteht. In jungen Fliegen ist eine Schwankung in der *dPark9*-Genexpression feststellbar (s. 7.4.3), die sich vom Expressionslevel 19 in einem Tag alten Männchen auf 12 in fünf Tage alten Fliegen reduziert. Möglicherweise bewirkt eine noch weitere Verringerung der *dPark9*-Menge in dieser Entwicklungsphase eine verstärkte Aktivität von Cathepsin D.

In gealterten Fliegen war dieser Effekt jedoch nicht mehr feststellbar. Die Aktivität des Enzyms verringerte sich, doch im Gegensatz zu bisherigen Veröffentlichungen war dieser Trend auch in der Kontrollgruppe zu finden und die Ergebnisse waren nicht signifikant unterschiedlich zu denen von jungen Fliegen. Da auch die Kontrolle eine Reduktion der Cathepsin D-Aktivität aufweist, scheint es sich um einen allgemeinen Trend zu handeln. Die Analyse des Expressionsniveaus von *dPark9* in 30 Tage alten männlichen Fliegen zeigt ebenfalls, dass in diesem Alter die Expression am niedrigsten ist (s. Abbildung 62). Somit hat

ein *knockdown* vermutlich keinen großen Einfluss mehr auf das bereits bestehende geringe Expressionslevel.

Im Gegensatz dazu konnte in KRS-Patienten nicht nur eine Reduktion in der Cathepsin D-Aktivität durch Mutationen in *ATP13A2* festgestellt werden, sondern auch eine Beeinträchtigung in der Reifung des Enzyms. Durch einen *ATP13A2-knockdown* kommt es zu einem Anstieg der Gesamtproteinmenge von Cathepsin D und einer Verschiebung in der Proteinmenge der einzelnen Enzymstufen. Defiziente Zellen wiesen einen höheren Anteil an Proenzymen und eine verringerte Menge an aktivem Enzym auf als die Kontrollzellen (Dehay *et al.*, 2012). Matsui *et al.* (2013) entdeckte eine Veränderung in der Morphologie und Verteilung von Lysosomen in SH-SY5Y-Zellen mit einem *ATP13A2-knockdown*. Die Lysosomen aggregierten in der Nähe des Zellkerns und zeigten eine verringerte Cathepsin D-Färbung.

Auch war die Proteinmenge in *ATP13A2*-homozygot mutanten Medakafischen ebenso verringert wie die Aktivität von Cathepsin D. Aufnahmen mit dem Elektronenmikroskop zeigten anormale Strukturen in einzelnen Zellen und Gehirnen, die an Fingerabdrücke erinnern (*fingerprint profile-like structures*). Ähnliche Strukturen wurden bereits in Neuronen von Cathepsin D-*knockout* Mäusen und in NCL-Patienten beschrieben, die vermutlich durch eine Störung des lysosomalen Signalwegs entstehen (Palmer *et al.*, 1992; Tyynelä *et al.*, 1993; Koike *et al.*, 2000).

Die Überexpression von *dPark9H* führte zum gegenteiligen Effekt. Die Cathepsin D-Aktivität war in sechs Tage alten Fliegen um 27% verringert, während sich in 35 Tage alten Fliegen die Aktivität leicht erhöhte. Auffallend ist die Gegensätzlichkeit der Ergebnisse zwischen dem *knockdown* und der Überexpression. Da auch hier die Werte der alten Fliegen nicht signifikant unterschiedlich zu denen von jungen Fliegen sind und die Kontrollgruppe ebenfalls diesen Trend aufweist, kann keine klare Aussage darüber getroffen werden, ob sich eine veränderte *dPark9*-Expression auf die Cathepsin D-Aktivität auswirkt.

## 5.7 Analyse der potentiellen Substrate von dPark9

PARK9 gehört wie bereits erwähnt zur Gruppe der  $P_{5B}$ -ATPasen. Diese Unterkategorie von Transportern ist bisher kaum beschrieben, so dass für *ATP13A2* keine Substratspezifität bekannt ist. Das Wissen über das Transportsubstrat der lysosomalen ATPase würde einen Einblick in die Entstehung und Pathogenese des KRS ermöglichen und die Entwicklung von spezifischen Medikamenten erleichtern.

Bislang wurde *ATP13A2* im Zusammenhang mit Metallen und Polyaminen von mehreren Arbeitsgruppen in verschiedenen Modellen beschrieben (s. 1.3.1). Das erste Metall, das im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde ist Zink.

### 5.7.1 Zink als mögliches Substrat von dPark9

Nach Eisen ist Zink das zweithäufigste Spurenelement im menschlichen Körper und wird für die Funktion einer Vielzahl von Enzymen als Cofaktor und in Zinkfingerdomänen von Proteinen benötigt. 50% des Zinks befindet sich im Cytoplasma sowie in Organellen, 30-40% im Zellkern und der verbleibende Rest in der Zellmembran (Tapiero und Tew, 2003).

Da Zinkionen hydrophil sind, werden sie über  $\text{Zn}^{2+}$ -Transporter über die Membran in die Zelle und in Organelle eingeschleust und gespeichert. Diese lassen sich in zwei Familien einteilen: Mitglieder der ZIP (*solute carrier 39A*) transportieren Zink in das Cytosol, entweder von außerhalb der Zelle oder aus dem Lumen von Organellen wie den Lysosomen oder dem ER. Die ZnT-Familie (*solute carrier 30A*) entfernen Zinkionen aus dem Cytosol, indem sie es in Organelle transportieren oder aus der Zelle schleusen (Kambe *et al.*, 2008).

Im Cytosol liegt Zink auf Grund seiner Toxizität nur in geringem Maße als freie aktive  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen vor. Der größte Teil ist an spezielle Proteine (Methallothioneine) gebunden und befindet sich somit in seiner inaktiven Form. Durch ein Gleichgewicht zwischen ZIPs, ZnTs und Methallothioneine werden der Ionenfluss und die freie Zinkkonzentration in der Zelle reguliert. Im Gehirn sind hohe Konzentration an  $\text{Zn}^{2+}$  in synaptischen Vesikeln von glutamatergen Neuronen vorhanden, die in den Bereichen Neocortex, Amygdala und Hippocampus zu finden sind (Sensi *et al.*, 2009). Mehrere Studien deuten darauf hin, dass Zink sowohl bei der Neurotransmitterübertragung als auch bei synaptischer Plastizität eine Rolle spielt (Hirzel *et al.*, 2006; Kodirov *et al.*, 2006).

Veränderungen in der  $\text{Zn}^{2+}$ -Homöostase wurden bereits in mehreren neurodegenerativen Erkrankungen beschrieben. In Parkinsonpatienten fanden sich erhöhte Zinkkonzentrationen sowohl in der *substantia nigra* als auch in der Cerebrospinalflüssigkeit (Dexter *et al.*, 1991; Hozumi *et al.*, 2011). Außerdem zählt die Exposition gegenüber Zink als ein Risikofaktor für die Entwicklung von Parkinson (Pals *et al.*, 2003). Im Zusammenhang mit dem KRS konnte eine Interaktion von Zink und Mangan mit zwei Peptidsequenzen von ATP13A2 nachgewiesen werden (Medici *et al.*, 2012).

Um den Einfluss von Zink auf die Lebensspanne zu untersuchen, wurden Fliegen Zinkchlorid exponiert. Obwohl die Lebensdauer in allen Genotypen reduziert war, zeigten sowohl *dPark9*-defiziente als auch *dPark9H*-überexprimierende Fliegen eine erhöhte Toleranz gegenüber dem Substrat (s. 4.5.2.1). Somit kann von einem schützenden Effekt des *dPark9*-*knockdowns* und der Überexpression gegenüber Zink ausgegangen werden.

Tsunemi und Krainc (2014) stellten hingegen in primären dermalen Fibroblasten von KRS-Patienten und in primären Mausneuronen fest, dass Zellen mit einer ATP13A2-Defizienz eine erhöhte Sensitivität gegenüber extrazellulärem Zink aufwiesen. Die Aufnahme von  $\text{Zn}^{2+}$  in die Lysosomen ist in mutanten Zellen verschlechtert, so dass es zu einer Akkumulation von  $\text{Zn}^{2+}$  im Cytosol kommt. Gleichzeitig wird die Expression von Zinktransportern erhöht, was auf einen kompensierenden Effekt schließen lässt. Die verringerte Aufnahme des Metalls in die Lysosomen führt zu einer Verschlechterung in deren Funktion. In hONs (*human olfactory neurosphere-derived*) Zelllinien mit ATP13A2-*loss-of-function* Mutationen ist eine verringerte intrazelluläre  $\text{Zn}^{2+}$ -Konzentration zu detektieren. Die Aufnahme von Zink in Vesikel ist ebenso beeinträchtigt wie die Funktion der Mitochondrien (Park *et al.*, 2014). Humane Neuroblastomazellen weisen bei ATP13A2-Defizienz ebenfalls eine erhöhte Sensitivität gegenüber Zink auf. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch in der Beeinträchtigung bei der Aufnahme von  $\text{Zn}^{2+}$  in Vesikel und der Lysosomenfunktion (Kong *et al.*, 2014).

Im Gegensatz zu den drei oben genannten Studien erfolgte die Analyse der Metallionensensitivität nicht in einem Zellkulturmodell, was die unterschiedlichen Ergebnisse erklären könnte. Der ubiquitäre *knockdown* von *dPark9* in einem komplexen Organismus, in diesem Fall *Drosophila*, ermöglicht direkte Interaktionen zwischen Zellen, Geweben und Organen, die in einem einzelligen Modell nicht möglich sind. Somit könnte Zink eine andere Wirkung auf *dPark9*-defiziente Fliegen ausüben als z.B. auf Fibroblasten.



Während die Zinkkonzentration im Cytosol im picomolaren Bereich ist, liegt der Wert in intrazellulären Kompartimenten im mikromolaren. Eine erhöhte Zinkmenge im Cytosol hat einen toxischen Effekt auf die Zelle. Aus der Analyse der Lokalisation von ATP13A2, YPK9 und dPark9H konnte festgestellt werden, dass alle diese orthologen Proteine in der Membran von Lysosomen und Endosomen bzw. deren Äquivalent vorkommen. In *Drosophila* führt eine Exposition gegenüber Zink zu einer Verkürzung der Lebensdauer in allen Genotypen. Der Schutz von *dPark9*-überexprimierenden Fliegen liegt demnach an einer geringeren  $\text{Zn}^{2+}$ -Konzentration im Cytosol.

Um diesen Effekt zu erzielen, ist folgendes Modell vorstellbar: In der Kontrolle werden die Zinkionen durch dPark9 in die Lysosomen transportiert und somit eine Akkumulation im Cytosol verhindert. Einige Ionen können auch an Metallothionine gebunden werden und befinden sich so in einem inaktiven Zustand. Bei einer vermehrten Expression von *dPark9* führt die gesteigerte Anzahl an ATPasen in der lysosomalen Membran dazu, dass  $\text{Zn}^{2+}$  schneller aus dem Cytosol entfernt werden kann als in Kontrollfliegen. In diesen Fall würde es zu einer Akkumulation von  $\text{Zn}^{2+}$  in Lysosomen und Endosomen und zu einer Vergrößerung in deren Volumen kommen. Eine Möglichkeit dies zu untersuchen wären EM-Aufnahmen. Dass dieses System auch limitiert ist, wird im Vergleich zu Saccharose sichtbar, da sich die Lebensdauer durch die Exposition gegenüber Zink doch erheblich verkürzt.

Der Einfluss von Zink auf die Lebensdauer von *dPark9*-defiziente Fliegen ist ähnlich wie bei der Überexpression. Da durch den *knockdown* mittels *actin-GAL4* schon von Entwicklungsbeginn eine verringerte Menge an dPark9 vorhanden ist, könnte ein Kompensationsmechanismus aktiviert worden sein. In *Drosophila melanogaster* sind bisher 17 Zinktransporter bekannt. Einige dieser dZips und dZnts sind essentiell für die Lebensfähigkeit der Fliege. So ist ein *knockdown* von *foi*, *dZip42C.1*, *dZnT33D* larval oder pupal letal (Lye *et al.*, 2012). Auch schwere Mutationen im dZip-Gen *Catecholamines up* (*Catsup*) führen zu einer frühen larvalen Letalität. Interessanterweise zeigen diese Mutanten eine verstärkte Tyrosinhydroxylaseaktivität und erhöhte Dopaminlevel. Bereiche, die auch bei Parkinson eine Rolle spielen (Stathakis *et al.*, 1999; Hsouna *et al.*, 2007).

Da die Zelle auf Grund der reduzierten dPark9-Menge Zink nicht mehr effizient genug in die Lysosomen transportieren kann, könnten möglicherweise die anderen Zinktransporter mittels eines *feedback-loops* herunter- (ZIP) bzw. hochreguliert (ZnTs) werden. Eine verringerte Anzahl an ZIPs in der Plasmamembran würde bei erhöhter extrazellulärer Zinkkonzentration die Aufnahme von  $\text{Zn}^{2+}$  in die Zelle reduzieren und eine toxische Konzentration erst später erreicht werden. Durch verstärkte Expression von ZnTs könnte gleichzeitig die Abgabe der Ionen in den Extrazellularraum beschleunigt werden. Das ein *knockout* von *ATP13A2* die Expression von Zinktransportern beeinflusst, konnte bereits von Park *et al.* (2014) in hONs festgestellt werden.

Um zu überprüfen, ob es sich bei dPark9 tatsächlich eine Rolle im Zinktransport spielt, bieten sich Toxizitäts- und Interaktionsstudien im Auge an. Lye *et al.* zeigten 2012, dass die Überexpression von *dZip42.C1* mittels *gmr-GAL4* keinen Augenphänotyp zur Folge hatte. Die Inkubation der Fliegen auf Zink-versetztem Medium führte allerdings zu einer Beeinträchtigung der Augenentwicklung in Abhängigkeit von der  $\text{Zn}^{2+}$ -Konzentration. Auf Grund der Homologie zum humanen hZIP1 wird eine Rolle bei der Zinkaufnahme vermutet. Durch die verstärkte Expression von *dZip42.C1* kommt es zu einem erhöhten Zinkimport und letztendlich zu Toxizität. Die Rettung eines *dZip*- bzw. *-dZnT*-Phänotyps durch die Überexpression von dPark9H im Komplexaue wäre eine Möglichkeit die Funktion von dPark9 weiter einzugrenzen.

Der Einfluss potentieller Substrate speziell auf die dopaminergen Neuronen wurde ebenfalls mit Hilfe der nuklearen GFP-Signalintensität analysiert (s. 4.5.4). Die Exposition von *dPark9*-RNAi- als auch von *cherry-RNAi*-Fliegen gegenüber Zinkchlorid führte zu keiner Veränderung der GFP-Intensität in den Neuronen im Vergleich zur entsprechenden Saccharosekontrolle. Auch auf die GFP-Signalstärke der Überexpression von *dPark9H* oder *lacZ* hatte die Zugabe des Metalls keinen Einfluss. Möglicherweise ist die Funktion der Neuronen bereits durch die *dPark9H*-Überexpression zu stark geschädigt, so dass keine großen Veränderungen mehr möglich sind.

Da bei allen Genotypen die Gabe von Zinkchlorid keinen Effekt auf die Signalintensität hatte, übt eine veränderte *dPark9*-Expression wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Neuronenintegrität aus. Ein eventueller Mangel an Zink wie bei den Parkinsonpatienten hätte sich durch eine Verbesserung des GFP-Signals bemerkbar gemacht.

### 5.7.2 Mangan als mögliches Substrat von dPark9

Neben Zink wurde noch ein weiteres Metall auf seine potentielle Substratfunktion hin getestet. Mangan gehört ebenso wie Zink zu den Spurenelementen und spielt eine wichtige Rolle beim Protein- und Energiestoffwechsel sowie dessen Regulierung, Knochenmineralisierung und Schutz vor reaktiven oxigenen Spezies (ROS) (Aschner *et al.*, 2009). Es fungiert als Cofaktor für eine Vielzahl von Proteinen wie die Mn-Superoxiddismutase oder Glutaminsynthetase (Morello *et al.*, 2007).  $Mn^{2+}$  wird in die Mitochondrien von Gehirn und Leber über Uniporter aufgenommen, die somit den Hauptspeicher der Zellen für Mangan darstellen (Gunter und Puskin, 1972; Liccione und Maines, 1988). Über verschiedene Transporter kann Mangan die Blut-Hirn- und die Blut-Cerebrospinalflüssigkeits-Schranke passieren. Die Konzentrationen sind in den einzelnen Gehirnregionen unterschiedlich; die größten Mengen kommen im Pallidum und Putamen vor (Prohaska, 1987). Eine Exposition gegenüber hohen Konzentrationen an Mangan über einen längeren Zeitraum führen zur Ausbildung von Manganismus. Dieses Syndrom zeigt Parkinson-ähnliche Symptome, unterscheidet sich aber in seinen klinischen Merkmalen (Olanow, 2004).

Eine Verbindung zwischen ATP13A2 und  $Mn^{2+}$ -Homöostase sowie -Toxizität wurde zuerst in *S. cerevisiae* nachgewiesen. Der *knockdown* des Orthologs *YPK9* führt zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Mangan. Die Überexpression des wildtypischen *YPK9* schützt die Zellen vor dessen Toxizität, wohingegen die Expression von mutierten Formen keinen Schutzeffekt zeigten (Gitler *et al.*, 2009; Schmidt *et al.*, 2009).

Bei der Untersuchung der Lebensspanne auf Manganchlorid zeigte sich ähnlich wie bei Zink ein protektiver Effekt sowohl des *dPark9-knockdowns* als auch der Überexpression von *dPark9H* auf die Lebensdauer der Fliegen (s. 4.5.2.2). Zellkulturergebnissen von Tan *et al.* (2011) und Covy *et al.* (2012) wiesen ebenfalls einen Schutz gegenüber Mangan durch die Expression von ATP13A2 nach. Die Arbeitsgruppe stellte die Theorie auf, dass Mangan durch zusätzliches PARK9 schneller aus dem Cytosol in Vesikel und Organelle befördert wird und zur Aufrechterhaltung der Homöostase beitragen könnte.

Weitere Studien zeigten ebenfalls, dass die Expression von ATP13A2 einen Schutz vor der Toxizität von Mangan darstellt. So bewirkt die Expression von ATP13A2 in Säugerzellkulturen (HEK293T, N2a) eine Resistenz gegenüber Mangan und eine geringere intrazelluläre  $Mn^{2+}$ -Konzentration. Die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien ist im Vergleich zu den Mutanten verringert, was auf einen positiven Einfluss von ATP13A2

auf die Lebensfähigkeit der Zellen schließen lässt. Des Weiteren war die Expression von *PARK9* unter  $Mn^{2+}$ -Exposition erhöht, so dass eine Beteiligung an der Regulierung der  $Mn^{2+}$ -Homöostase naheliegt (Tan *et al.*, 2011). Die Arbeitsgruppe um Covy *et al.* (2012) wies ebenfalls einen schützenden Effekt von ATP13A2 in *human blastoma* Zellen (NLF) nach. Auf Grund der Ergebnisse, dass *PARK9* exprimierende Zellen zusätzlich resistenter vor oxidativen, proteasomalen und mitochondriellen Stress sind, wird angenommen, dass diese Wirkung nicht allein durch den Transport von  $Mn^{2+}$ -Ionen zu Stande kommt. Vielmehr wird eine Rolle im Import eines Cofaktors für die Lysosomenfunktion oder die Regulierung eines *feedback*-Mechanismus der Apoptose vermutet.

Der Transport von Mangan kann über mehrere verschiedene Transportsysteme erfolgen. So sind z.B. der Transferrinrezeptor, DMT1, Calciumkanäle und Magnesiumtransporter daran beteiligt. Interessanterweise können auch die Symporter ZIP8 und ZIP14, die Mitglieder der SLC39-Familie sind, für einen Transport verwendet werden (Bowman *et al.*, 2011). Somit besteht eine Verbindung im Transport von Zink- und Manganionen. Da *dPark9-knockdown*-Fliegen ähnlich wie bei Zink resistenter gegenüber Mangan sind, könnte auch hier mit Hilfe eines *feedback-loops* die Expression der Mangantransporter inhibiert werden. Die Aufnahme von Mangan würde sich verringern und die Zellen sind infolgedessen geschützter gegenüber den hohen extrazellulären  $Mn^{2+}$ -Konzentrationen. Ob *dPark9* letztendlich ein Transporter für Zink oder Mangan ist, kann durch diese Versuche nicht bestimmt werden. Eine veränderte *dPark9*-Expression beeinflusst die Lebensdauer bei Zink- oder Manganexposition jedoch positiv.

Bei der Analyse des GFP-Signals der dopaminergen Neuronen nach der Exposition gegenüber Mangan zeigte sich eine Reduktion der Intensität in alle Genotypen, die in *dPark9*-defizienten Fliegen etwas stärker ausgeprägt war als in der Kontrolle. Auch *dPark9H*-Überexpressionsfliegen waren durch die Zugabe von Mangan beeinträchtigt (s. 4.5.2.1). Jedoch ist es wie bereits oben erwähnt auf Grund der geringen Signalintensität auf Saccharose schwierig eine starke Verschlechterung zu detektieren, so dass auch in diesem Fall die Ergebnisse vorsichtig betrachtet werden müssen.

Wird ein gesunder Mensch über einen längeren Zeitraum hohen Konzentrationen an Mangan ausgesetzt, so entwickelt dieser die Krankheit Manganismus (s. o.). Hier ist im Gegensatz zu Parkinson in erster Linie der *Globus pallidus* betroffen, die auftretenden Symptome zeigen aber Ähnlichkeiten mit einer typischen Parkinsonerkrankung. Obwohl keine Degeneration von dopaminergen Neuronen festgestellt werden konnte, ist deren Funktion durch die Manganexposition beeinträchtigt. Durch die Internalisierung des Dopamintransporters aus der Plasmamembran wird die Wiederaufnahme von Dopamin und dessen Efflux verringert (Roth *et al.*, 2013). Des Weiteren konnte mittels XRF (X-ray Fluoreszenz) - Mikroskopie nicht nur in den Gehirnbereichen *Globus pallidus* und Thalamus eine Akkumulation von Mangan detektiert werden, sondern auch in der *substantia nigra* (Robison *et al.*, 2015). Der genaue Mechanismus der Mangantoxizität ist noch nicht bekannt, doch scheint eine Reaktion des Metalls mit Aminen und die Umwandlung dieser in reaktive oxigene Spezies (ROS) eine Hauptursache darzustellen (Benedetto *et al.*, 2009).

Die Aufnahme von  $Mn^{2+}$ -Ionen in Neuronen kann über verschiedene Transporter wie DMT1,  $Ca^{2+}$ -Kanäle oder auch dem Importer ZIP8 erfolgen. Dreiwertige Ionen werden über den Transferrinrezeptor aufgenommen. Obwohl die relative Verteilung all dieser Transporter noch nicht aufgeklärt ist, sind wahrscheinlich alle an der Aufrechterhaltung der Homöostase beteiligt. Abhängig von Zelltyp sind verschiedene Transporter exprimiert und legen fest, welche Oxidationsstufen in die Zelle gelangen (Au *et al.*, 2008; Gunter *et al.*, 2013).

Die Verschlechterung des GFP-Signals in allen Genotypen zeigt, dass eine veränderte *dPark9*-Expression keinen Einfluss auf die Neuronenintegrität hat. Die Verschlechterung der Neuronenfunktion könnte durch die verstärkte Manganaufnahme und im Folgenden durch die Bildung von ROS entstehen, die diesen Effekt noch weiter verstärken.

Auf Grund der Tatsache, dass keine Genmutation vorliegen muss um die dopaminergen Neuronen zu schädigen und der verschiedenen Aufnahmemechanismen von Manganionen kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob *dPark9* auch am Transport von Mangan in Neuronen beteiligt ist.

### 5.7.3 Norspermidin als mögliches Substrat von *dPark9*

Neben der Möglichkeit eines Metalltransporters wurde CG32000 auch als Teil des Polyamintransportsystems in *Drosophila* gefunden (Barnette *et al.*, 2012). Die drei Polyamine Putrescin, Spermidin und Spermin kommen in Pro- und Eukaryoten vor und werden für eine Vielzahl von zellulären Funktionen benötigt (Casero und Woster, 2009). Auf Grund ihrer positiven Ladung können sie mit negativ geladenen Molekülen wie DNA, RNA, Proteinen und Lipiden interagieren und Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose beeinflussen (Watanabe *et al.*, 1991; Miyamoto *et al.*, 1993; Wallace *et al.*, 2003). In niedrigen intrazellulären Konzentrationen tragen Polyamine zum Überleben und zur Proliferation der Zellen bei. Da hohe Konzentrationen wahrscheinlich toxisch sind, ist eine exakte Regulierung durch Synthese, Abbau und Transport nötig (Takao *et al.*, 2006). In Krebszellen ist die Produktion von Polyaminen während des Wachstums stark erhöht, was diesen Syntheseweg als möglichen Angriffspunkt für Inhibitoren und Analoga attraktiv macht (Wallace *et al.*, 2003).

Norspermidin ist ein Analogon zu Spermidin und kommt in einigen Pflanzen, Bakterien und Algen, allerdings nicht im Menschen, vor (Hamana und Matsuzaki, 1982; Rodriguez-Garay *et al.*, 1989). In Mäusen wurde es als antineoplastisches Mittel erfolgreich bei Leukämie, Lymphomen und Karzinomen getestet (Prakash *et al.*, 1988). Heinick *et al.* (2010) fand durch einen genetischen Screen in *C. elegans* das Gen *CATP-5* als Polyamintransporter (P5<sub>B</sub>-ATPase). Das Protein ist in der Apikalmembran von Darmzellen wie auch in exkretorischen Zellen lokalisiert und an der Aufnahme von Polyamin in die Zelle beteiligt. Eine Deletion im Gen führt zu einer Resistenz des Wurms gegenüber Norspermidin. Die größte Ähnlichkeit weist *CATP-5* mit *CATP-6* und *CATP-7* in *C. elegans* sowie mit *ATP13A2*, *ATP13A3* und *ATP13A4* im Menschen auf.

In CHO-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Expression von *ATP13A2* zu einer größeren Sensitivität gegenüber den Polyaminen Spermidin und Paraquat führt (Pinto *et al.*, 2012; De La Hera *et al.*, 2013). Der Aufnahmemechanismus von Polyaminen in die Zelle ist bisher noch nicht genau aufgeklärt. Soulet *et al.* (2004) favorisieren ein zweistufiges Model: die Aufnahme des Polyamins in die Zelle erfolgt über einen Transporter, gefolgt von dem limitierenden Schritt der Verteilung in *polyamine-sequestering vesicles* (PSVs) über einen H<sup>+</sup>-abhängigen Transport. Da die Lokalisation von *ATP13A2* mehrfach in den Lysosomen nachgewiesen wurde, könnte das eine mögliche Aufgabe des Membranproteins sein.

Die Exposition der Fliegen gegenüber Norspermidin bewirkte einen toxischen Effekt auf die Gesamtlebensdauer aller Genotypen (s. 4.5.3). Da die Inkubation auf Saccharose bereits zu einer reduzierten Lebensdauer der *dPark9-knockdown*-Fliegen führt, muss dieser Faktor bei

der Analyse der Norspermidinkurven mit einbezogen werden (s. 4.5.1). Betrachtet man nun die Werte für Norspermidin, so zeigt sich ein geringer bis kein Einfluss des Polyamins. *dPark9*-defiziente Fliegen sind weder durch die verminderte Expression der P<sub>5</sub>-ATPase geschützt oder sensibler als die Kontrollfliegen.

Die Überexpression von *dPark9H* führte ebenfalls zu einer erhöhten Suszeptibilität der Fliegen gegenüber Norspermidin im Vergleich zur Kontrolle. Auch hier ist nur ein minimaler Effekt feststellbar, da Überexpressionsfliegen auf Saccharose bereits eine kürzere Lebensspanne aufweisen als die Kontrolle. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Toxizität von Norspermidin auf die Fliegen nicht durch eine veränderte *dPark9*-Expression beeinflusst wird.

Um definitiv ausschließen zu können, dass dPark9 kein Polyamintransporter ist, wäre eine Analyse der Polyaminaufnahme sinnvoll. Die Kultivierung von *Drosophila* Bein-Imaginalscheiben stellt ein einfaches Modell dar, da sie *in vitro* kultiviert werden können und durch Zugabe von Ecdyson ein rudimentäres Bein ausbilden. Störungen in der Entwicklung sind leicht zu erkennen und durch Verwendung von markierten Polyaminen kann die Konzentration unter verschiedenen genetischen Bedingungen (z.B. *knockdown*, Überexpression) gemessen werden (Tsen *et al.*, 2008).

Die Untersuchung der dopaminergen Neuronen nach der Exposition gegenüber Norspermidin zeigte eine weniger stark reduzierte GFP-Intensität der *dPark9 RNAi*-Fliegen im Vergleich zur Kontrolle, so dass diese geschützt waren (s. 4.5.4.3). Die Überexpression von *dPark9H* bewirkte sogar eine leichte Verbesserung der Signalstärke. Wie Polyamine speziell im Fall von Neuronen aufgenommen werden, ist noch wenig erforscht. Bekannt ist, dass Gliazellen und synaptische Vesikel über einen effizienten Transportmechanismus verfügen (Masuko *et al.*, 2003). Warum ein *dPark9-knockdown* bzw. eine *dPark9H*-Überexpression die dopaminergen Neuronen vor der Toxizität von Norspermidin schützt, kann nur spekuliert werden. Eine verminderte Aufnahme des Polyamins in die Neuronen könnte eine Ursache darstellen.

Die Ergebnisse aus den Lebensdauerexperimenten und der Analyse der GFP-Signalintensität der dopaminergen Neuronen ergeben ein komplexes Bild über den Einfluss der verschiedenen potentiellen Substrate. Ein positiver Effekt auf die Lebensdauer führt nicht automatisch zu einem besseren GFP-Signal, so dass keine Ionenart völlig ausgeschlossen werden kann. Weitere Versuche sind notwendig um letztendlich das Substrat zu bestimmen (s. o.). Außerdem bedarf der Versuch eine Beeinträchtigung der dopaminergen Neuronen mittels GFP-Intensität zu bestimmen, noch weiterer Verbesserungen. So ließe die Verwendung einer *dPark9H*-Überexpressionslinie mit einer weniger stark ausgeprägten Neurodegeneration unter Standardbedingungen eine bessere Analyse zu. Auf Grund des bereits starken Verlusts und des geringen GFP-Signals reagieren die Neuronen eventuell sensibler auf Stressfaktoren oder können keine starken Effekte mehr ausprägen und erschweren somit eine genaue Analyse.

## 6 Literaturverzeichnis

Adams M. D., Celniker S. E., Holt R. A., Evans C. A., Gocayne J. D., Amanatides P. G., Scherer S. E., Li P. W., Hoskins R. A., Galle R. F., George R. A., Lewis S. E., Richards S., Ashburner M., Henderson S. N., Sutton G. G., Wortman J. R., Yandell M. D., Zhang Q., Chen L. X., Brandon R. C., Rogers Y. H., Blazej R. G., Champe M., Pfeiffer B. D., Wan K. H., Doyle C., Baxter E. G., Helt G., Nelson C. R., Gabor G. L., Abril J. F., Agbayani A., An H. J., Andrews-Pfannkoch C., Baldwin D., Ballew R. M., Basu A., Baxendale J., Bayraktaroglu L., Beasley E. M., Beeson K. Y., Benos P. V., Berman B. P., Bhandari D., Bolshakov S., Borkova D., Botchan M. R., Bouck J., Brokstein P., Brottier P., Burtis K. C., Busam D. A., Butler H., Cadieu E., Center A., Chandra I., Cherry J. M., Cawley S., Dahlke C., Davenport L. B., Davies P., de Pablos B., Delcher A., Deng Z., Mays A. D., Dew I., Dietz S. M., Dodson K., Doup L. E., Downes M., Dugan-Rocha S., Dunkov B. C., Dunn P., Durbin K. J., Evangelista C. C., Ferraz C., Ferriera S., Fleischmann W., Fosler C., Gabrielian A. E., Garg N. S., Gelbart W. M., Glasser K., Glodek A., Gong F., Gorrell J. H., Gu Z., Guan P., Harris M., Harris N. L., Harvey D., Heiman T. J., Hernandez J. R., Houck J., Hostin D., Houston K. A., Howland T. J., Wei M. H., Ibegwam C., Jalali M., Kalush F., Karpen G. H., Ke Z., Kennison J. A., Ketchum K. A., Kimmel B. E., Kodira C. D., Kraft C., Kravitz S., Kulp D., Lai Z., Lasko P., Lei Y., Levitsky A. A., Li J., Li Z., Liang Y., Lin X., Liu X., Mattei B., McIntosh T. C., McLeod M. P., McPherson D., Merkulov G., Milshina N. V., Mobarry C., Morris J., Moshrefi A., Mount S. M., Moy M., Murphy B., Murphy L., Muzny D. M., Nelson D. L., Nelson D. R., Nelson K. A., Nixon K., Nusskern D. R., Pacleb J. M., Palazzolo M., Pittman G. S., Pan S., Pollard J., Puri V., Reese M. G., Reinert K., Remington K., Saunders R. D., Scheeler F., Shen H., Shue B. C., Sidén-Kiamos I., Simpson M., Skupski M. P., Smith T., Spier E., Spradling A. C., Stapleton M., Strong R., Sun E., Svirskaas R., Tector C., Turner R., Venter E., Wang A. H., Wang X., Wang Z. Y., Wassarman D. A., Weinstock G. M., Weissenbach J., Williams S. M., WoodageT null, Worley K. C., Wu D., Yang S., Yao Q. A., Ye J., Yeh R. F., Zaveri J. S., Zhan M., Zhang G., Zhao Q., Zheng L., Zheng X. H., Zhong F. N., Zhong W., Zhou X., Zhu S., Zhu X., Smith H. O., Gibbs R. A., Myers E. W., Rubin G. M. und Venter J. C. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* (New York, N.Y.), 287 (5461), 2185–2195.

Albers R. W. (1967). Biochemical aspects of active transport. *Annual Review of Biochemistry*, 36, 727–756.

Aschner M., Erikson K. M., Herrero Hernández E., Hernández E. H. und Tjalkens R. (2009). Manganese and its role in Parkinson's disease: from transport to neuropathology. *Neuromolecular Medicine*, 11 (4), 252–266.

Atkin G. und Paulson H. (2014). Ubiquitin pathways in neurodegenerative disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 7, 63.

Au C., Benedetto A. und Aschner M. (2008). Manganese transport in eukaryotes: the role of DMT1. *Neurotoxicology*, 29 (4), 569–576.

Auluck P. K., Caraveo G. und Lindquist S. (2010).  $\alpha$ -Synuclein: membrane interactions and toxicity in Parkinson's disease. *Annual review of cell and developmental biology*, 26, 211–233.

Ausubel A. M., Brent R., Kingston R. E., Smith J. A., Seidmann J. G. und Struhl D. (1996). *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, New York.

Axelsen K. B. und Palmgren M. G. (1998). Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *Journal of molecular evolution*, 46 (1), 84–101.

Barnette N. K., Kreinbrink V. und von Kalm L. (2012). A P5B-type ATPase is required for *Drosophila* polyamine transport. 53rd Annual *Drosophila* Research Conference.

Bayersdorfer F., Voigt A., Schneuwly S. und Botella J. A. (2010). Dopamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila* models of familial and sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of disease*, 40 (1), 113–119.

- Behrens M. I., Brüggemann N., Chana P., Venegas P., Kägi M., Parrao T., Orellana P., Garrido C., Rojas C. V., Hauke J., Hahnen E., González R., Seleme N., Fernández V., Schmidt A., Binkofski F., Kömpf D., Kubisch C., Hagenah J., Klein C. und Ramirez A. (2010). Clinical spectrum of Kufor-Rakeb syndrome in the Chilean kindred with ATP13A2 mutations. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 25 (12), 1929–1937.
- Bekris L. M., Mata I. F. und Zabetian C. P. (2010). The Genetics of Parkinson Disease. *Journal of geriatric psychiatry and neurology*, 23 (4), 228–242.
- Belin A. C. und Westerlund M. (2008). Parkinson's disease: a genetic perspective. *The FEBS journal*, 275 (7), 1377–1383.
- Benedetto A., Au C. und Aschner M. (2009). Manganese-induced dopaminergic neurodegeneration: insights into mechanisms and genetics shared with Parkinson's disease. *Chemical reviews*, 109 (10), 4862–4884.
- Benes P., Vetvicka V. und Fusek M. (2008). Cathepsin D - Many functions of one aspartic protease. *Critical reviews in oncology/hematology*, 68 (1), 12–28.
- Bennett M. C., Bishop J. F., Leng Y., Chock P. B., Chase T. N. und Mouradian M. M. (1999). Degradation of  $\alpha$ -Synuclein by Proteasome. *Journal of Biological Chemistry*, 274 (48), 33855–33858.
- Betarbet R., Sherer T. B. und Greenamyre J. T. (2002). Animal models of Parkinson's disease. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 24 (4), 308–318.
- Bilen J. und Bonini N. M. (2005). Drosophila as a model for human neurodegenerative disease. *Annual Review of Genetics*, 39, 153–171.
- Bloor J. W. und Kiehart D. P. (2001). zipper Nonmuscle myosin-II functions downstream of PS2 integrin in Drosophila myogenesis and is necessary for myofibril formation. *Developmental Biology*, 239 (2), 215–228.
- Blumenstock S. (2012). Neurodegeneration and autophagy in a park9 Parkinson model in Drosophila melanogaster. Masterarbeit, Universität Regensburg.
- Botella J. A., Bayersdorfer F. und Schneuwly S. (2008). Superoxide dismutase overexpression protects dopaminergic neurons in a Drosophila model of Parkinson's disease. *Neurobiology of disease*, 30 (1), 65–73.
- Bour B. A., O'Brien M. A., Lockwood W. L., Goldstein E. S., Bodmer R., Taghert P. H., Abmayr S. M. und Nguyen H. T. (1995). Drosophila MEF2, a transcription factor that is essential for myogenesis. *Genes & Development*, 9 (6), 730–741.
- Bowman A. B., Kwakye G. F., Herrero Hernández E. und Aschner M. (2011). Role of manganese in neurodegenerative diseases. *Journal of trace elements in medicine and biology: organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, 25 (4), 191–203.
- Brand A. H. und Perrimon N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development (Cambridge, England)*, 118 (2), 401–415.
- Bras J., Verloes A., Schneider S. A., Mole S. E. und Guerreiro R. J. (2012). Mutation of the parkinsonism gene ATP13A2 causes neuronal ceroid-lipofuscinosis. *Human molecular genetics*, 21 (12), 2646–2650.
- Bublitz M., Morth J. P. und Nissen P. (2011). P-type ATPases at a glance. *Journal of Cell Science*, 124 (Pt 15), 2515–2519.
- Bushey D., Tononi G. und Cirelli C. (2009). The Drosophila fragile X mental retardation gene regulates sleep need. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29 (7), 1948–1961.



Casero R. A. und Woster P. M. (2009). Recent advances in the development of polyamine analogues as antitumor agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52 (15), 4551–4573.

Chan H. Y. und Bonini N. M. (2000). *Drosophila* models of human neurodegenerative disease. *Cell Death and Differentiation*, 7 (11), 1075–1080.

Chartier-Harlin M.-C., Kachergus J., Roumier C., Mouroux V., Douay X., Lincoln S., Levecque C., Larvor L., Andrieux J., Hulihan M., Waucquier N., Defebvre L., Amouyel P., Farrer M. und Destée A. (2004). Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet*, 364 (9440), 1167–1169.

Chen C.-M., Lin C.-H., Juan H.-F., Hu F.-J., Hsiao Y.-C., Chang H.-Y., Chao C.-Y., Chen I.-C., Lee L.-C., Wang T.-W., Chen Y.-T., Chen Y.-T., Lee-Chen G.-J. und Wu Y.-R. (2011). ATP13A2 variability in Taiwanese Parkinson's disease. *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics: the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, 156B (6), 720–729.

Clark I. E., Dodson M. W., Jiang C., Cao J. H., Huh J. R., Seol J. H., Yoo S. J., Hay B. A. und Guo M. (2006). *Drosophila* pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature*, 441 (7097), 1162–1166.

Conway K. A., Harper J. D. und Lansbury P. T. (1998). Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease. *Nature Medicine*, 4 (11), 1318–1320.

Conway K. A., Harper J. D. und Lansbury P. T. (2000). Fibrils formed in vitro from alpha-synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid. *Biochemistry*, 39 (10), 2552–2563.

Coppedè F. (2012). Genetics and epigenetics of Parkinson's disease. *TheScientificWorldJournal*, 2012, 489830.

Costello W. J. und Wyman R. J. (1986). Development of an indirect flight muscle in a muscle-specific mutant of *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology*, 118 (1), 247–258.

Covy J. P., Waxman E. A. und Giasson B. I. (2012). Characterization of cellular protective effects of ATP13A2/PARK9 expression and alterations resulting from pathogenic mutants. *Journal of neuroscience research*, 90 (12), 2306–2316.

Crosiers D., Ceulemans B., Meeus B., Nuytemans K., Pals P., Van Broeckhoven C., Cras P. und Theuns J. (2011). Juvenile dystonia-parkinsonism and dementia caused by a novel ATP13A2 frameshift mutation. *Parkinsonism & related disorders*, 17 (2), 135–138.

Cuervo A. M., Bergamini E., Brunk U. T., Dröge W., Ffrench M. und Terman A. (2005). Autophagy and aging: the importance of maintaining 'clean' cells. *Autophagy*, 1 (3), 131–140.

Cuervo A. M. und Dice J. F. (1996). A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science (New York, N.Y.)*, 273 (5274), 501–503.

Cuervo A. M., Stefanis L., Fredenburg R., Lansbury P. T. und Sulzer D. (2004). Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science (New York, N.Y.)*, 305 (5688), 1292–1295.

Cullen V., Lindfors M., Ng J., Paetau A., Swinton E., Kolodziej P., Boston H., Saftig P., Woulfe J., Feany M. B., Myllykangas L., Schlossmacher M. G. und Tyynelä J. (2009). Cathepsin D expression level affects alpha-synuclein processing, aggregation, and toxicity in vivo. *Molecular brain*, 2, 5.

Deas E., Plun-Favreau H., Gandhi S., Desmond H., Kjaer S., Loh S. H. Y., Renton A. E. M., Harvey R. J., Whitworth A. J., Martins L. M., Abramov A. Y. und Wood N. W. (2011). PINK1 cleavage at position A103 by the mitochondrial protease PARL. *Human Molecular Genetics*, 20 (5), 867–879.

Dehay B., Ramirez A., Martinez-Vicente M., Perier C., Canron M.-H., Doudnikoff E., Vital A., Vila M., Klein C. und Bezard E. (2012). Loss of P-type ATPase ATP13A2/PARK9 function induces general lysosomal deficiency and leads to Parkinson disease neurodegeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109 (24), 9611–9616.

Dexter D. T., Carayon A., Javoy-Agid F., Agid Y., Wells F. R., Daniel S. E., Lees A. J., Jenner P. und Marsden C. D. (1991). Alterations in the levels of iron, ferritin and other trace metals in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. *Brain: A Journal of Neurology*, 114 ( Pt 4), 1953–1975.

Dice J. F. (1990). Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends in Biochemical Sciences*, 15 (8), 305–309.

Dietzl G., Chen D., Schnorrer F., Su K.-C., Barinova Y., Fellner M., Gasser B., Kinsey K., Oppel S., Scheiblaue S., Couto A., Marra V., Keleman K. und Dickson B. J. (2007). A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature*, 448 (7150), 151–156.

Dirscherl P. (2014). Functional analysis of alternative transcripts of the *Drosophila* Parkinson related gene CG32000. Masterarbeit, Universität Regensburg.

Djarmati A., Hagenah J., Reetz K., Winkler S., Behrens M. I., Pawlack H., Lohmann K., Ramirez A., Tadić V., Brüggemann N., Berg D., Siebner H. R., Lang A. E., Pramstaller P. P., Binkofski F., Kostić V. S., Volkmann J., Gasser T. und Klein C. (2009). ATP13A2 variants in early-onset Parkinson's disease patients and controls. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 24 (14), 2104–2111.

Dutta D., Bloor J. W., Ruiz-Gomez M., VijayRaghavan K. und Kiehart D. P. (2002). Real-time imaging of morphogenetic movements in *Drosophila* using Gal4-UAS-driven expression of GFP fused to the actin-binding domain of moesin. *Genesis (New York, N.Y.: 2000)*, 34 (1-2), 146–151.

Ebrahimi-Fakhari D., Cantuti-Castelvetri I., Fan Z., Rockenstein E., Masliah E., Hyman B. T., McLean P. J. und Unni V. K. (2011). Distinct roles in vivo for the ubiquitin-proteasome system and the autophagy-lysosomal pathway in the degradation of  $\alpha$ -synuclein. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31 (41), 14508–14520.

Eiberg H., Hansen L., Korbo L., Nielsen I. M., Svenstrup K., Bech S., Pinborg L. H., Friberg L., Hjerlind L. E., Olsen O. R. und Nielsen J. E. (2012). Novel mutation in ATP13A2 widens the spectrum of Kufor-Rakeb syndrome (PARK9). *Clinical genetics*, 82 (3), 256–263.

Farias F. H. G., Zeng R., Johnson G. S., Wininger F. A., Taylor J. F., Schnabel R. D., McKay S. D., Sanders D. N., Lohi H., Seppälä E. H., Wade C. M., Lindblad-Toh K., O'Brien D. P. und Katz M. L. (2011). A truncating mutation in ATP13A2 is responsible for adult-onset neuronal ceroid lipofuscinosis in Tibetan terriers. *Neurobiology of disease*, 42 (3), 468–474.

Feany M. B. und Bender W. W. (2000). A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature*, 404 (6776), 394–398.

Fernandes J., Bate M. und Vijayraghavan K. (1991). Development of the indirect flight muscles of *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)*, 113 (1), 67–77.

Fernandes J. J. und Keshishian H. (1996). Patterning the dorsal longitudinal flight muscles (DLM) of *Drosophila*: insights from the ablation of larval scaffolds. *Development (Cambridge, England)*, 122 (12), 3755–3763.

Fiesel P. (2013). Ectopic expression and phenotypic analysis of PD-associated human ATP13A2 and its putative orthologue dPark9-H in *Drosophila*. Masterarbeit, Universität Regensburg.

Flybase: <http://flybase.org/>

Fong C. Y., Rolfs A., Schwarzbraun T., Klein C. und O'Callaghan F. J. K. (2011). Juvenile parkinsonism associated with heterozygous frameshift ATP13A2 gene mutation. *European journal of*

paediatric neurology: EJPN: official journal of the European Paediatric Neurology Society, 15 (3), 271–275.

Fonseca R., Vabulas R. M., Hartl F. U., Bonhoeffer T. und Nägerl U. V. (2006). A balance of protein synthesis and proteasome-dependent degradation determines the maintenance of LTP. *Neuron*, 52 (2), 239–245.

Di Fonzo A., Chien H. F., Socal M., Giraudo S., Tassorelli C., Iliceto G., Fabbrini G., Marconi R., Fincati E., Abbruzzese G., Marini P., Squitieri F., Horstink M. W., Montagna P., Libera A. D., Stocchi F., Goldwurm S., Ferreira J. J., Meco G., Martignoni E., Lopiano L., Jardim L. B., Oostra B. A., Barbosa E. R., Italian Parkinson Genetics Network und Bonifati V. (2007). ATP13A2 missense mutations in juvenile parkinsonism and young onset Parkinson disease. *Neurology*, 68 (19), 1557–1562.

Freeman M. (1996). Reiterative use of the EGF receptor triggers differentiation of all cell types in the *Drosophila* eye. *Cell*, 87 (4), 651–660.

Friggi-Grelin F., Coulom H., Meller M., Gomez D., Hirsh J. und Birman S. (2003). Targeted gene expression in *Drosophila* dopaminergic cells using regulatory sequences from tyrosine hydroxylase. *Journal of Neurobiology*, 54 (4), 618–627.

Fujioka S. und Wszolek Z. K. (2012). Update on genetics of parkinsonism. *Neuro-Degenerative Diseases*, 10 (1-4), 257–260.

Gerlitz O., Nellen D., Ottiger M. und Basler K. (2002). A screen for genes expressed in *Drosophila* imaginal discs. *The International Journal of Developmental Biology*, 46 (1), 173–176.

Gitler A. D., Chesi A., Geddie M. L., Strathearn K. E., Hamamichi S., Hill K. J., Caldwell K. A., Caldwell G. A., Cooper A. A., Rochet J.-C. und Lindquist S. (2009). Alpha-synuclein is part of a diverse and highly conserved interaction network that includes PARK9 and manganese toxicity. *Nature genetics*, 41 (3), 308–315.

Greene A. W., Grenier K., Aguilera M. A., Muise S., Farazifard R., Haque M. E., McBride H. M., Park D. S. und Fon E. A. (2012). Mitochondrial processing peptidase regulates PINK1 processing, import and Parkin recruitment. *EMBO reports*, 13 (4), 378–385.

Greene J. C., Whitworth A. J., Kuo I., Andrews L. A., Feany M. B. und Pallanck L. J. (2003). Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila* parkin mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (7), 4078–4083.

Green E. W., Fedele G., Giorgini F. und Kyriacou C. P. (2014). A *Drosophila* RNAi collection is subject to dominant phenotypic effects. *Nature Methods*, 11 (3), 222–223.

Grünewald A., Arns B., Seibler P., Rakovic A., Münchau A., Ramirez A., Sue C. M. und Klein C. (2012). ATP13A2 mutations impair mitochondrial function in fibroblasts from patients with Kufor-Rakeb syndrome. *Neurobiology of Aging*, 33 (8), 1843.e1–e7.

Gunter T. E., Gerstner B., Gunter K. K., Malecki J., Gelein R., Valentine W. M., Aschner M. und Yule D. I. (2013). Manganese transport via the transferrin mechanism. *Neurotoxicology*, 34, 118–127.

Gunter T. E. und Puskin J. S. (1972). Manganous ion as a spin label in studies of mitochondrial uptake of manganese. *Biophysical Journal*, 12 (6), 625–635.

Guo M., Hong E. J., Fernandes J., Zipursky S. L. und Hay B. A. (2003). A reporter for amyloid precursor protein gamma-secretase activity in *Drosophila*. *Human Molecular Genetics*, 12 (20), 2669–2678.

Gusdon A. M., Zhu J., Van Houten B. und Chu C. T. (2012). ATP13A2 regulates mitochondrial bioenergetics through macroautophagy. *Neurobiology of disease*, 45 (3), 962–972.

Hamamichi S., Rivas R. N., Knight A. L., Cao S., Caldwell K. A. und Caldwell G. A. (2008). Hypothesis-based RNAi screening identifies neuroprotective genes in a Parkinson's disease model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105 (2), 728–733.

Hamana K. und Matsuzaki S. (1982). Widespread occurrence of norspermidine and norspermine in eukaryotic algae. *Journal of Biochemistry*, 91 (4), 1321–1328.

Hampshire D. J., Roberts E., Crow Y., Bond J., Mubaidin A., Wriekat A. L., Al-Din A. und Woods C. G. (2001). Kufor-Rakeb syndrome, pallido-pyramidal degeneration with supranuclear upgaze paresis and dementia, maps to 1p36. *Journal of medical genetics*, 38 (10), 680–682.

Hassan, B. (2001.8.23). P{Lsp2-GAL4.H} construct and insertion. Personal communication to FlyBase.

Heberlein U. und Rubin G. M. (1990). Structural and functional comparisons of the *Drosophila virilis* and *Drosophila melanogaster* rough genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87 (15), 5916–5920.

Heinick A., Urban K., Roth S., Spies D., Nunes F., Phanstiel O. 4th, Liebau E. und Lüersen K. (2010). *Caenorhabditis elegans* P5B-type ATPase CATP-5 operates in polyamine transport and is crucial for norspermidine-mediated suppression of RNA interference. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24 (1), 206–217.

Helfrich-Förster C. und Homberg U. (1993). Pigment-dispersing hormone-immunoreactive neurons in the nervous system of wild-type *Drosophila melanogaster* and of several mutants with altered circadian rhythmicity. *The Journal of Comparative Neurology*, 337 (2), 177–190.

De La Hera D. P., Corradi G. R., Adamo H. P. und De Tezanos Pinto F. (2013). Parkinson's disease-associated human P5B-ATPase ATP13A2 increases spermidine uptake. *The Biochemical journal*, 450 (1), 47–53.

Hershko A. und Ciechanover A. (1998). The ubiquitin system. *Annual Review of Biochemistry*, 67, 425–479.

Hirth F. (2010). *Drosophila melanogaster* in the study of human neurodegeneration. *CNS & neurological disorders drug targets*, 9 (4), 504–523.

Hirzel K., Müller U., Latal A. T., Hülsmann S., Grudzinska J., Seeliger M. W., Betz H. und Laube B. (2006). Hyperekplexia phenotype of glycine receptor alpha1 subunit mutant mice identifies Zn(2+) as an essential endogenous modulator of glycinergic neurotransmission. *Neuron*, 52 (4), 679–690.

Hozumi I., Hasegawa T., Honda A., Ozawa K., Hayashi Y., Hashimoto K., Yamada M., Koumura A., Sakurai T., Kimura A., Tanaka Y., Satoh M. und Inuzuka T. (2011). Patterns of levels of biological metals in CSF differ among neurodegenerative diseases. *Journal of the Neurological Sciences*, 303 (1-2), 95–99.

Hsouna A., Lawal H. O., Izevbaye I., Hsu T. und O'Donnell J. M. (2007). *Drosophila* dopamine synthesis pathway genes regulate tracheal morphogenesis. *Developmental Biology*, 308 (1), 30–43.

Ito K., Awano W., Suzuki K., Hiromi Y. und Yamamoto D. (1997). The *Drosophila* mushroom body is a quadruple structure of clonal units each of which contains a virtually identical set of neurones and glial cells. *Development (Cambridge, England)*, 124 (4), 761–771.

Jackson G. R., Salecker I., Dong X., Yao X., Arnheim N., Faber P. W., MacDonald M. E. und Zipursky S. L. (1998). Polyglutamine-expanded human huntingtin transgenes induce degeneration of *Drosophila* photoreceptor neurons. *Neuron*, 21 (3), 633–642.

Jalanko A. und Bräulke T. (2009). Neuronal ceroid lipofuscinoses. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1793 (4), 697–709.

- Jansen A. H. P., Reits E. A. J. und Hol E. M. (2014). The ubiquitin proteasome system in glia and its role in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 7, 73.
- Jardetzky O. (1966). Simple allosteric model for membrane pumps. *Nature*, 211 (5052), 969–970.
- Kambe T., Weaver B. P. und Andrews G. K. (2008). The genetics of essential metal homeostasis during development. *Genesis (New York, N.Y.: 2000)*, 46 (4), 214–228.
- Katzmann D. J., Odorizzi G. und Emr S. D. (2002). Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 3 (12), 893–905.
- Khodosh R., Augsburger A., Schwarz T. L. und Garrity P. A. (2006). Bchs, a BEACH domain protein, antagonizes Rab11 in synapse morphogenesis and other developmental events. *Development (Cambridge, England)*, 133 (23), 4655–4665.
- Kirkegaard K., Taylor M. P. und Jackson W. T. (2004). Cellular autophagy: surrender, avoidance and subversion by microorganisms. *Nature Reviews. Microbiology*, 2 (4), 301–314.
- Klucken J., McLean P., Winkler J. und Hyman B. (2007). Lysosomal degradation and alpha-synuclein aggregation and toxicity. Department of Neurology, University of Regensburg and MGH Harvard Medical School, Boston.
- Kodirov S. A., Takizawa S., Joseph J., Kandel E. R., Shumyatsky G. P. und Bolshakov V. Y. (2006). Synaptically released zinc gates long-term potentiation in fear conditioning pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (41), 15218–15223.
- Koike M., Nakanishi H., Saftig P., Ezaki J., Isahara K., Ohsawa Y., Schulz-Schaeffer W., Watanabe T., Waguri S., Kametaka S., Shibata M., Yamamoto K., Kominami E., Peters C., von Figura K. und Uchiyama Y. (2000). Cathepsin D deficiency induces lysosomal storage with ceroid lipofuscin in mouse CNS neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20 (18), 6898–6906.
- Kong S. M. Y., Chan B. K. K., Park J.-S., Hill K. J., Aitken J. B., Cottle L., Farghaian H., Cole A. R., Lay P. A., Sue C. M. und Cooper A. A. (2014). Parkinson's disease-linked human PARK9/ATP13A2 maintains zinc homeostasis and promotes  $\alpha$ -Synuclein externalization via exosomes. *Human molecular genetics*, 23 (11), 2816–2833.
- Kozak M. (1989). The scanning model for translation: an update. *The Journal of Cell Biology*, 108 (2), 229–241.
- Krüger R., Kuhn W., Müller T., Voitalla D., Graeber M., Kösel S., Przuntek H., Epplen J. T., Schöls L. und Riess O. (1998). Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nature Genetics*, 18 (2), 106–108.
- Kyttälä A., Lahtinen U., Braulke T. und Hofmann S. L. (2006). Functional biology of the neuronal ceroid lipofuscinoses (NCL) proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1762 (10), 920–933.
- Lear B. C., Zhang L. und Allada R. (2009). The neuropeptide PDF acts directly on evening pacemaker neurons to regulate multiple features of circadian behavior. *PLoS biology*, 7 (7), e1000154.
- Lesage S. und Brice A. (2009). Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Human Molecular Genetics*, 18 (R1), R48–R59.
- Lesage S. und Brice A. (2012). Role of mendelian genes in 'sporadic' Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, 18 Suppl 1, S66–S70.
- Liccione J. J. und Maines M. D. (1988). Selective vulnerability of glutathione metabolism and cellular defense mechanisms in rat striatum to manganese. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 247 (1), 156–161.

Life Technology: <https://www.thermofisher.com/de/de/home.html>

Lim A. und Kraut R. (2009). The Drosophila BEACH family protein, blue cheese, links lysosomal axon transport with motor neuron degeneration. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29 (4), 951–963.

Lin C. H., Tan E. K., Chen M. L., Tan L. C., Lim H. Q., Chen G. S. und Wu R. M. (2008). Novel ATP13A2 variant associated with Parkinson disease in Taiwan and Singapore. *Neurology*, 71 (21), 1727–1732.

Lin D. M. und Goodman C. S. (1994). Ectopic and increased expression of Fasciclin II alters motoneuron growth cone guidance. *Neuron*, 13 (3), 507–523.

Lindsley D. L. und Grell E. H. (1968). Genetic variations of *Drosophila melanogaster*. Carnegie Institution of Washington Publication, Washington.

Lindsley D. L. und Zimm G. G. (1992). *The Genome of Drosophila Melanogaster*. San Diego: Academic Press.

Liu Y., Fallon L., Lashuel H. A., Liu Z. und Lansbury P. T. (2002). The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell*, 111 (2), 209–218.

Love S. (2005). Neuropathological investigation of dementia: a guide for neurologists. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 76 Suppl 5, v8–v14.

Lye J. C., Richards C. D., Dechen K., Paterson D., de Jonge M. D., Howard D. L., Warr C. G. und Burke R. (2012). Systematic functional characterization of putative zinc transport genes and identification of zinc toxicosis phenotypes in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Experimental Biology*, 215 (Pt 18), 3254–3265.

Malakouti-Nejad M., Shahidi G.-A., Rohani M., Shojaee S. M., Hashemi M., Klotzle B., Fan J.-B. und Elahi E. (2014). Identification of p.Gln858\* in ATP13A2 in two EOPD patients and presentation of their clinical features. *Neuroscience Letters*, 577, 106–111.

Mao X.-Y., Burgunder J.-M., Zhang Z.-J., Chang X.-L., Peng R., Burgunder J.-M., Yang Y., Wang Y.-C., Li T. und Zhang Z.-J. (2010). ATP13A2 G2236A variant is rare in patients with early-onset Parkinson's disease and familial Parkinson's disease from Mainland China. *Parkinsonism & related disorders*, 16 (3), 235–236.

Marsden C. D. (1990). Parkinson's disease. *Lancet*, 335 (8695), 948–952.

Masuko T., Kusama-Eguchi K., Sakata K., Kusama T., Chaki S., Okuyama S., Williams K., Kashiwagi K. und Igarashi K. (2003). Polyamine transport, accumulation, and release in brain. *Journal of Neurochemistry*, 84 (3), 610–617.

Matsui H., Sato F., Sato S., Koike M., Taruno Y., Saiki S., Funayama M., Ito H., Taniguchi Y., Uemura N., Toyoda A., Sakaki Y., Takeda S., Uchiyama Y., Hattori N. und Takahashi R. (2013). ATP13A2 deficiency induces a decrease in cathepsin D activity, fingerprint-like inclusion body formation, and selective degeneration of dopaminergic neurons. *FEBS letters*, 587 (9), 1316–1325.

Medici S., Peana M., Delogu L. G. und Zoroddu M. A. (2012). Mn(II) and Zn(II) interactions with peptide fragments from Parkinson's disease genes. *Dalton Transactions (Cambridge, England: 2003)*, 41 (15), 4378–4388.

Meier E. (2011). Etablierung und Analyse der dPark9-RNA-Interferenz bei *Drosophila Schneider* (S2) Zellen. Bachelorarbeit, Universität Regensburg.

- Miyamoto S., Kashiwagi K., Ito K., Watanabe S. und Igarashi K. (1993). Estimation of polyamine distribution and polyamine stimulation of protein synthesis in *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 300 (1), 63–68.
- Møller A. B., Asp T., Holm P. B. und Palmgren M. G. (2008). Phylogenetic analysis of P5 P-type ATPases, a eukaryotic lineage of secretory pathway pumps. *Molecular phylogenetics and evolution*, 46 (2), 619–634.
- Morello M., Zatta P., Zambenedetti P., Martorana A., D'Angelo V., Melchiorri G., Bernardi G. und Sancesario G. (2007). Manganese intoxication decreases the expression of manganoproteins in the rat basal ganglia: an immunohistochemical study. *Brain Research Bulletin*, 74 (6), 406–415.
- Mortimore G. E., Pösö A. R. und Lardeux B. R. (1989). Mechanism and regulation of protein degradation in liver. *Diabetes/Metabolism Reviews*, 5 (1), 49–70.
- Najim al-Din A. S., Wriekat A., Mubaidin A., Dasouki M. und Hiari M. (1994). Pallido-pyramidal degeneration, supranuclear upgaze paresis and dementia: Kufor-Rakeb syndrome. *Acta Neurologica Scandinavica*, 89 (5), 347–352.
- Narendra D. P., Jin S. M., Tanaka A., Suen D.-F., Gautier C. A., Shen J., Cookson M. R. und Youle R. J. (2010). PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS biology*, 8 (1), e1000298.
- Nässel D. R. und Elekes K. (1992). Aminergic neurons in the brain of blowflies and *Drosophila*: dopamine- and tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons and their relationship with putative histaminergic neurons. *Cell and tissue research*, 267 (1), 147–167.
- Navarro J. A., Heßner S., Yenissetti S. C., Bayersdorfer F., Zhang L., Voigt A., Schneuwly S. und Botella J. A. (2014). Analysis of dopaminergic neuronal dysfunction in genetic and toxin-induced models of Parkinson's disease in *Drosophila*. *Journal of Neurochemistry*.
- Ning Y. P., Kanai K., Tomiyama H., Li Y., Funayama M., Yoshino H., Sato S., Asahina M., Kuwabara S., Takeda A., Hattori T., Mizuno Y. und Hattori N. (2008). PARK9-linked parkinsonism in eastern Asia: mutation detection in ATP13A2 and clinical phenotype. *Neurology*, 70 (16 Pt 2), 1491–1493.
- Olanow C. W. (2004). Manganese-induced parkinsonism and Parkinson's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1012, 209–223.
- Ortega Z. und Lucas J. J. (2014). Ubiquitin-proteasome system involvement in Huntington's disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 7, 77.
- Palmer D. N., Fearnley I. M., Walker J. E., Hall N. A., Lake B. D., Wolfe L. S., Haltia M., Martinus R. D. und Jolly R. D. (1992). Mitochondrial ATP synthase subunit c storage in the ceroid-lipofuscinoses (Batten disease). *American Journal of Medical Genetics*, 42 (4), 561–567.
- Palmgren M. G. und Nissen P. (2011). P-type ATPases. *Annual Review of Biophysics*, 40, 243–266.
- Pals P., Van Everbroeck B., Grubben B., Viaene M. K., Dom R., van der Linden C., Santens P., Martin J. J. und Cras P. (2003). Case-control study of environmental risk factors for Parkinson's disease in Belgium. *European Journal of Epidemiology*, 18 (12), 1133–1142.
- Parkinson J. (1817). *An essay on the shaking palsy*. London: Sherwood, Neely and Jones.
- Park J., Lee S. B., Lee S., Kim Y., Song S., Kim S., Bae E., Kim J., Shong M., Kim J.-M. und Chung J. (2006). Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature*, 441 (7097), 1157–1161.
- Park J.-S., Koentjoro B., Veivers D., Mackay-Sim A. und Sue C. M. (2014). Parkinson's disease-associated human ATP13A2 (PARK9) deficiency causes zinc dyshomeostasis and mitochondrial dysfunction. *Human molecular genetics*, 23 (11), 2802–2815.



- Park J.-S., Mehta P., Cooper A. A., Veivers D., Heimbach A., Stiller B., Kubisch C., Fung V. S., Krainc D., Mackay-Sim A. und Sue C. M. (2011a). C. Human mutation, 32 (8), 956–964.
- Park J.-S., Mehta P., Cooper A. A., Veivers D., Heimbach A., Stiller B., Kubisch C., Fung V. S., Krainc D., Mackay-Sim A. und Sue C. M. (2011b). Pathogenic effects of novel mutations in the P-type ATPase ATP13A2 (PARK9) causing Kufoor-Rakeb syndrome, a form of early-onset parkinsonism. Human Mutation, 32 (8), 956–964.
- Park S. S., Schulz E. M. und Lee D. (2007). Disruption of dopamine homeostasis underlies selective neurodegeneration mediated by alpha-synuclein. The European Journal of Neuroscience, 26 (11), 3104–3112.
- Pesah Y., Pham T., Burgess H., Middlebrooks B., Verstrecken P., Zhou Y., Harding M., Bellen H. und Mardon G. (2004). Drosophila parkin mutants have decreased mass and cell size and increased sensitivity to oxygen radical stress. Development (Cambridge, England), 131 (9), 2183–2194.
- Pinto F. de T., Corradi G. R., de la Hera D. P. und Adamo H. P. (2012). CHO cells expressing the human P<sub>5</sub>-ATPase ATP13A2 are more sensitive to the toxic effects of herbicide paraquat. Neurochemistry International, 60 (3), 243–248.
- Podhajska A., Musso A., Trancikova A., Stafa K., Moser R., Sonnay S., Glauser L. und Moore D. J. (2012). Common pathogenic effects of missense mutations in the P-type ATPase ATP13A2 (PARK9) associated with early-onset parkinsonism. PloS one, 7 (6), e39942.
- Polymeropoulos M. H., Lavedan C., Leroy E., Ide S. E., Dehejia A., Dutra A., Pike B., Root H., Rubenstein J., Boyer R., Stenroos E. S., Chandrasekharappa S., Athanassiadou A., Papapetropoulos T., Johnson W. G., Lazzarini A. M., Duvoisin R. C., Di Iorio G., Golbe L. I. und Nussbaum R. L. (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. Science (New York, N.Y.), 276 (5321), 2045–2047.
- Prakash N. J., Bowlin T. L., Davis G. F., Sunkara P. S. und Sjoerdsma A. (1988). Antitumor activity of norspermidine, a structural homologue of the natural polyamine spermidine. Anticancer Research, 8 (4), 563–568.
- Prelich G. (2012). Gene overexpression: uses, mechanisms, and interpretation. Genetics, 190 (3), 841–854.
- Prohaska J. R. (1987). Functions of trace elements in brain metabolism. Physiological Reviews, 67 (3), 858–901.
- Qiao L., Hamamichi S., Caldwell K. A., Caldwell G. A., Yacoubian T. A., Wilson S., Xie Z.-L., Speake L. D., Parks R., Crabtree D., Liang Q., Crimmins S., Schneider L., Uchiyama Y., Iwatsubo T., Zhou Y., Peng L., Lu Y., Standaert D. G., Walls K. C., Shacka J. J., Roth K. A. und Zhang J. (2008). Lysosomal enzyme cathepsin D protects against alpha-synuclein aggregation and toxicity. Molecular brain, 1, 17.
- Rajawat Y. S. und Bossis I. (2008). Autophagy in aging and in neurodegenerative disorders. Hormones (Athens, Greece), 7 (1), 46–61.
- Ramirez A., Heimbach A., Gründemann J., Stiller B., Hampshire D., Cid L. P., Goebel I., Mubaidin A. F., Wriekat A.-L., Roeper J., Al-Din A., Hillmer A. M., Karsak M., Liss B., Woods C. G., Behrens M. I. und Kubisch C. (2006). Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. Nature genetics, 38 (10), 1184–1191.
- Ramonet D., Podhajska A., Stafa K., Sonnay S., Trancikova A., Tsika E., Pletnikova O., Troncoso J. C., Glauser L. und Moore D. J. (2012). PARK9-associated ATP13A2 localizes to intracellular acidic vesicles and regulates cation homeostasis and neuronal integrity. Human molecular genetics, 21 (8), 1725–1743.

- Reiter L. T., Potocki L., Chien S., Gribskov M. und Bier E. (2001). A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Research*, 11 (6), 1114–1125.
- Renn S. C., Park J. H., Rosbash M., Hall J. C. und Taghert P. H. (1999). A pdf neuropeptide gene mutation and ablation of PDF neurons each cause severe abnormalities of behavioral circadian rhythms in *Drosophila*. *Cell*, 99 (7), 791–802.
- Roberts P., Moshitch-Moshkovitz S., Kvam E., O'Toole E., Winey M. und Goldfarb D. S. (2003). Piecemeal microautophagy of nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 14 (1), 129–141.
- Robinow S. und White K. (1988). The locus *elav* of *Drosophila melanogaster* is expressed in neurons at all developmental stages. *Developmental Biology*, 126 (2), 294–303.
- Robison G., Sullivan B., Cannon J. R. und Pushkar Y. (2015). Identification of dopaminergic neurons of the substantia nigra pars compacta as a target of manganese accumulation. *Metallomics: Integrated Biometal Science*.
- Rodriguez-Garay B., Phillips G. C. und Kuehn G. D. (1989). Detection of Norspermidine and Norspermine in *Medicago sativa* L. (Alfalfa). *Plant physiology*, 89 (2), 525–529.
- Rost B. (1999). Twilight zone of protein sequence alignments. *Protein Engineering*, 12 (2), 85–94.
- Roth J. A., Li Z., Sridhar S. und Khoshbouei H. (2013). The effect of manganese on dopamine toxicity and dopamine transporter (DAT) in control and DAT transfected HEK cells. *Neurotoxicology*, 35, 121–128.
- Rubinsztein D. C., DiFiglia M., Heintz N., Nixon R. A., Qin Z.-H., Ravikumar B., Stefanis L. und Tolkovsky A. (2005). Autophagy and its possible roles in nervous system diseases, damage and repair. *Autophagy*, 1 (1), 11–22.
- Sambrook J., Fritsch E. F. und Maniatis T. (1989). *Molecular cloning - a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Samii A., Nutt J. G. und Ransom B. R. (2004). Parkinson's disease. *Lancet*, 363 (9423), 1783–1793.
- Santoro L., Breedveld G. J., Manganello F., Iodice R., Pisciotto C., Nolano M., Punzo F., Quarantelli M., Pappatà S., Di Fonzo A., Oostra B. A. und Bonifati V. (2011). Novel ATP13A2 (PARK9) homozygous mutation in a family with marked phenotype variability. *Neurogenetics*, 12 (1), 33–39.
- Schmidt K., Wolfe D. M., Stiller B. und Pearce D. A. (2009). Cd<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> and Se<sup>2+</sup> toxicity to *Saccharomyces cerevisiae* lacking YPK9p the orthologue of human ATP13A2. *Biochemical and biophysical research communications*, 383 (2), 198–202.
- Schneider I. (1972). Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *Journal of embryology and experimental morphology*, 27 (2), 353–365.
- Schneider S. A., Paisan-Ruiz C., Quinn N. P., Lees A. J., Houlden H., Hardy J. und Bhatia K. P. (2010). ATP13A2 mutations (PARK9) cause neurodegeneration with brain iron accumulation. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 25 (8), 979–984.
- Schultheis P. J., Fleming S. M., Clippinger A. K., Lewis J., Tsunemi T., Giasson B., Dickson D. W., Mazzulli J. R., Bardgett M. E., Haik K. L., Ekhtor O., Chava A. K., Howard J., Gannon M., Hoffman E., Chen Y., Prasad V., Linn S. C., Tamargo R. J., Westbroek W., Sidransky E., Krainc D. und Shull G. E. (2013). Atp13a2-deficient mice exhibit neuronal ceroid lipofuscinosis, limited  $\alpha$ -synuclein accumulation and age-dependent sensorimotor deficits. *Human molecular genetics*, 22 (10), 2067–2082.

- Schultheis P. J., Hagen T. T., O'Toole K. K., Tachibana A., Burke C. R., McGill D. L., Okunade G. W. und Shull G. E. (2004). Characterization of the P5 subfamily of P-type transport ATPases in mice. *Biochemical and biophysical research communications*, 323 (3), 731–738.
- Scott R. C., Schuldiner O. und Neufeld T. P. (2004). Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body. *Developmental cell*, 7 (2), 167–178.
- Sensi S. L., Paoletti P., Bush A. I. und Sekler I. (2009). Zinc in the physiology and pathology of the CNS. *Nature reviews. Neuroscience*, 10 (11), 780–791.
- Setsuie R. und Wada K. (2007). The functions of UCH-L1 and its relation to neurodegenerative diseases. *Neurochemistry International*, 51 (2-4), 105–111.
- Sevlever D., Jiang P. und Yen S.-H. C. (2008). Cathepsin D is the main lysosomal enzyme involved in the degradation of alpha-synuclein and generation of its carboxy-terminally truncated species. *Biochemistry*, 47 (36), 9678–9687.
- Shimura H., Hattori N., Kubo S. i, Mizuno Y., Asakawa S., Minoshima S., Shimizu N., Iwai K., Chiba T., Tanaka K. und Suzuki T. (2000). Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nature Genetics*, 25 (3), 302–305.
- Shimura H., Schlossmacher M. G., Hattori N., Frosch M. P., Trockenbacher A., Schneider R., Mizuno Y., Kosik K. S. und Selkoe D. J. (2001). Ubiquitination of a new form of alpha-synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease. *Science (New York, N.Y.)*, 293 (5528), 263–269.
- Shulman J. M., De Jager P. L. und Feany M. B. (2011). Parkinson's disease: genetics and pathogenesis. *Annual Review of Pathology*, 6, 193–222.
- Singleton A. B., Farrer M., Johnson J., Singleton A., Hague S., Kachergus J., Hulihan M., Peuralinna T., Dutra A., Nussbaum R., Lincoln S., Crawley A., Hanson M., Maraganore D., Adler C., Cookson M. R., Muentner M., Baptista M., Miller D., Blancato J., Hardy J. und Gwinn-Hardy K. (2003). alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science (New York, N.Y.)*, 302 (5646), 841.
- Smith J. E. und Cronmiller C. (2001). The *Drosophila* daughterless gene autoregulates and is controlled by both positive and negative cis regulation. *Development (Cambridge, England)*, 128 (23), 4705–4714.
- Sorkin A. und Von Zastrow M. (2002). Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 3 (8), 600–614.
- Soulet D., Gagnon B., Rivest S., Audette M. und Poulin R. (2004). A fluorescent probe of polyamine transport accumulates into intracellular acidic vesicles via a two-step mechanism. *The Journal of biological chemistry*, 279 (47), 49355–49366.
- Spencer B., Potkar R., Trejo M., Rockenstein E., Patrick C., Gindi R., Adame A., Wyss-Coray T. und Masliah E. (2009). Beclin 1 gene transfer activates autophagy and ameliorates the neurodegenerative pathology in alpha-synuclein models of Parkinson's and Lewy body diseases. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29 (43), 13578–13588.
- Stathakis D. G., Burton D. Y., Mclvor W. E., Krishnakumar S., Wright T. R. und O'Donnell J. M. (1999). The catecholamines up (Catsup) protein of *Drosophila melanogaster* functions as a negative regulator of tyrosine hydroxylase activity. *Genetics*, 153 (1), 361–382.
- Takao K., Rickhag M., Hegardt C., Oredsson S. und Persson L. (2006). Induction of apoptotic cell death by putrescine. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38 (4), 621–628.
- Tan J., Zhang T., Jiang L., Chi J., Hu D., Pan Q., Wang D. und Zhang Z. (2011). Regulation of intracellular manganese homeostasis by Kufor-Rakeb syndrome-associated ATP13A2 protein. *The Journal of biological chemistry*, 286 (34), 29654–29662.

- Tapiero H. und Tew K. D. (2003). Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomédecine & Pharmacothérapie*, 57 (9), 399–411.
- Thummel C. S. und Pirrotta V. (1992). New pCaSper P element vectors. *Drosophila Information Service*, 71:150.
- Toyoshima C. (2009). How Ca<sup>2+</sup>-ATPase pumps ions across the sarcoplasmic reticulum membrane. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1793 (6), 941–946.
- Tsen C., Iltis M., Kaur N., Bayer C., Delcros J.-G., von Kalm L. und Phanstiel O. (2008). A *Drosophila* model to identify polyamine-drug conjugates that target the polyamine transporter in an intact epithelium. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51 (2), 324–330.
- Tsunemi T. und Krainc D. (2014). Zn<sup>2+</sup> dyshomeostasis caused by loss of ATP13A2/PARK9 leads to lysosomal dysfunction and alpha-synuclein accumulation. *Human Molecular Genetics*, 23 (11), 2791–2801.
- Tyynelä J., Palmer D. N., Baumann M. und Haltia M. (1993). Storage of saposins A and D in infantile neuronal ceroid-lipofuscinosis. *FEBS letters*, 330 (1), 8–12.
- Ugolino J., Fang S., Kubisch C. und Monteiro M. J. (2011). Mutant Atp13a2 proteins involved in parkinsonism are degraded by ER-associated degradation and sensitize cells to ER-stress induced cell death. *Human molecular genetics*, 20 (18), 3565–3577.
- Usenovic M., Knight A. L., Ray A., Wong V., Brown K. R., Caldwell G. A., Caldwell K. A., Stagliar I. und Krainc D. (2012). Identification of novel ATP13A2 interactors and their role in  $\alpha$ -synuclein misfolding and toxicity. *Human molecular genetics*, 21 (17), 3785–3794.
- Usenovic M., Tresse E., Mazzulli J. R., Taylor J. P. und Krainc D. (2012). Deficiency of ATP13A2 leads to lysosomal dysfunction,  $\alpha$ -synuclein accumulation, and neurotoxicity. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 32 (12), 4240–4246.
- van Veen S., Sørensen D. M., Holemans T., Holen H. W., Palmgren M. G. und Vangheluwe P. (2014). Cellular function and pathological role of ATP13A2 and related P-type transport ATPases in Parkinson's disease and other neurological disorders. *Frontiers in molecular neuroscience*, 7, 48.
- Wallace H. M., Fraser A. V. und Hughes A. (2003). A perspective of polyamine metabolism. *The Biochemical Journal*, 376 (Pt 1), 1–14.
- Watanabe S., Kusama-Eguchi K., Kobayashi H. und Igarashi K. (1991). Estimation of polyamine binding to macromolecules and ATP in bovine lymphocytes and rat liver. *The Journal of Biological Chemistry*, 266 (31), 20803–20809.
- Webb J. L., Ravikumar B., Atkins J., Skepper J. N. und Rubinsztein D. C. (2003). Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *The Journal of biological chemistry*, 278 (27), 25009–25013.
- Weber N.-M. (2010). A *Drosophila* model of Kufor-Rakeb syndrome. Bachelorarbeit, Universität Regensburg.
- Weimer J. M., Kriscenski-Perry E., Elshatory Y. und Pearce D. A. (2002). The neuronal ceroid lipofuscinoses: mutations in different proteins result in similar disease. *Neuromolecular Medicine*, 1 (2), 111–124.
- Weissman A. M., Shabek N. und Ciechanover A. (2011). The predator becomes the prey: regulating the ubiquitin system by ubiquitylation and degradation. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 12 (9), 605–620.

- Whitaker J. N., Terry L. C. und Whetsell W. O. (1981). Immunocytochemical localization of cathepsin D in rat neural tissue. *Brain Research*, 216 (1), 109–124.
- White K. E., Humphrey D. M. und Hirth F. (2010). The dopaminergic system in the aging brain of *Drosophila*. *Frontiers in neuroscience*, 4, 205.
- Wilkinson K. D., Lee K. M., Deshpande S., Duerksen-Hughes P., Boss J. M. und Pohl J. (1989). The neuron-specific protein PGP 9.5 is a ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase. *Science (New York, N.Y.)*, 246 (4930), 670–673.
- Williams D. R., Hadeed A., al-Din A. S. N., Wreikat A.-L. und Lees A. J. (2005). Kufor Rakeb disease: autosomal recessive, levodopa-responsive parkinsonism with pyramidal degeneration, supranuclear gaze palsy, and dementia. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 20 (10), 1264–1271.
- Wöhlke A., Philipp U., Bock P., Beineke A., Lichtner P., Meitinger T. und Distl O. (2011). A one base pair deletion in the canine ATP13A2 gene causes exon skipping and late-onset neuronal ceroid lipofuscinosis in the Tibetan terrier. *PLoS genetics*, 7 (10), e1002304.
- Xilouri M., Brekk O. R. und Stefanis L. (2013).  $\alpha$ -Synuclein and protein degradation systems: a reciprocal relationship. *Molecular Neurobiology*, 47 (2), 537–551.
- Yang X. und Xu Y. (2014). Mutations in the ATP13A2 Gene and Parkinsonism: A Preliminary Review. *BioMed Research International*, 2014, 371256.
- Ye Y. und Fortini M. E. (1999). Apoptotic activities of wild-type and Alzheimer's disease-related mutant presenilins in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Cell Biology*, 146 (6), 1351–1364.
- Zarranz J. J., Alegre J., Gómez-Esteban J. C., Lezcano E., Ros R., Ampuero I., Vidal L., Hoenicka J., Rodriguez O., Atarés B., Llorens V., Gomez Tortosa E., del Ser T., Muñoz D. G. und de Yébenes J. G. (2004). The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Annals of Neurology*, 55 (2), 164–173.
- Zvelebil M. J. und Baum J. O. (2008). *Understanding Bioinformatics*. Garland Science.

## 7 Anhang

### 7.1 Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der Aktivierung und Inhibierung der Basalganglien....	8
Abbildung 2: Gen- und Proteinstruktur von $\alpha$ -Synuclein.....	10
Abbildung 3: Proteinstruktur von ATP13A2.....	12
Abbildung 4: Transportmechanismus von ATPasen. ....	13
Abbildung 5: Zunahme der Größe und Anzahl von Lysotracker-positiven Vesikeln in Fibroblasten von KRS-Patienten. ....	15
Abbildung 6: Übersicht über das UPS. ....	17
Abbildung 7: Der Autophagiesignalweg. ....	18
Abbildung 8: Methoden zur Untersuchung der Genfunktion in <i>D. melanogaster</i> . ....	20
Abbildung 9: Aufbau des Blots.....	32
Abbildung 10: Übersicht über das dopaminerge System im Gehirn von <i>D. melanogaster</i> .....	33
Abbildung 11: Übersicht über das Gen CG32000, mit den verschiedenen Transkript- und Proteinisoformen. ....	37
Abbildung 12: Zweidimensionale Struktur von dPark9H. ....	38
Abbildung 13: Ausschnitt aus dem Alignment der charakteristischen Domänen von CG32000 und PARK9. ....	38
Abbildung 14: Klonierungsstrategie für pUAST- <i>dPark9H-GFP</i> . ....	39
Abbildung 15: Lokalisation von dPark9H- und dPark9H-GFP in S2-Zellen. ....	41
Abbildung 16: Lokalisation von dPark9H-GFP im larvalen Fettkörper.....	42
Abbildung 17: Analyse der <i>knockdown</i> -Effizienz bei den beiden Linien RNAi 1 und 2 mittels RT-PCR.....	43
Abbildung 18: Überprüfung der Überexpressionsstärke mittels RT-PCR. ....	44
Abbildung 19: Lebensdauer von <i>dPark9</i> -defizienten und <i>dPark9H</i> -überexprimierenden Fliegen auf Standardmedium.....	45
Abbildung 20: Negative Geotaxis von sieben Tage alten <i>dPark9</i> -RNAi- Fliegen.....	46
Abbildung 21: Negative Geotaxis der Überexpressionslinien.....	47
Abbildung 22: Überexpression von dPark9H führt zu einem Augenphänotyp. ....	47
Abbildung 23: Raster-EM-Aufnahmen vom <i>dPark9H</i> -Augenphänotyp.....	48
Abbildung 24: Kein Verlust von dopaminergen Neuronen in <i>dPark9</i> -defizienten Fliegen. ....	49
Abbildung 25: Neurodegeneration ist abhängig von der Stärke der <i>dPark9H</i> -Überexpression. ....	50
Abbildung 26: Überexpression von <i>dPark9H</i> führt zu einem Verlust von dopaminergen Neuronen. ....	51
Abbildung 27: Verlust von dopaminergen Neuronen und des GFP-Signals in <i>UAS-stinger GFP/UAS-dPark9H D13; Th-GAL4/+</i> - Fliegen. ....	52
Abbildung 28: Quantifizierung der GFP-Signalintensität zeigt keinen Unterschied in sieben Tage alten <i>dPark9-knockdown</i> -Gehirnen.....	53
Abbildung 29: Reduktion der GFP-Signalintensität in 49 Tage alten <i>dPark9</i> -defizienten Fliegen. ....	54

Abbildung 30: Reduzierte GFP-Signalintensität in sieben Tage alten <i>dPark9H</i> -Überexpressionsfliegen. ....	54
Abbildung 31: Übersicht über PDF-Neuronen. ....	55
Abbildung 32: Analyse der PDF-Neuronen in <i>dPark9H</i> -überexprimierenden Fliegen zeigt keine Degeneration. ....	56
Abbildung 33: <i>Knockdown</i> von <i>dPark9</i> führt zu einem Phänotyp in der DLM. ....	58
Abbildung 34: <i>Knockdown</i> von <i>dPark9</i> im adulten Stadium mittels des <i>UAS-Gal80ts</i> -System erzeugt keinen Muskelphänotyp. ....	59
Abbildung 35: Die Überexpression von <i>dPark9H</i> führt zu keinem Muskelphänotyp der DLM. ....	59
Abbildung 36: Überexpression von <i>dPark9H</i> rettet den <i>dPark9-RNAi</i> 1-Phänotyp. ....	60
Abbildung 37: Verkürzte Lebensdauer von <i>dPark9</i> -defizienten Fliegen auf 10% Saccharose. ....	61
Abbildung 38: Überexpressionsfliegen sind sensitiver auf 10% Saccharose. ....	62
Abbildung 39: Verschlechterung der GFP-Signalintensität nach siebentägiger Inkubation der <i>dPark9-knockdown</i> -Fliegen auf einer 10% Saccharoselösung. ....	63
Abbildung 40: Inkubation auf 10% Saccharose beeinträchtigt die GFP-Intensität der dopaminergen Neuronen in <i>dPark9H</i> -überexprimierenden Fliegen und der Kontrollgruppe. ....	64
Abbildung 41: Verlängerte Lebensdauer von <i>dPark9-knockdown</i> -Fliegen auf 2 mM $ZnCl_2$ in 10% Saccharose-Lösung. ....	65
Abbildung 42: Die Überexpression von <i>dPark9H</i> führt zu einer Verlängerung der Lebensdauer auf 2 mM $ZnCl_2$ . ....	66
Abbildung 43: Schützender Effekt von $MnCl_2$ für <i>dPark9</i> -defiziente Fliegen. ....	67
Abbildung 44: Mangan führt zu einer längeren Lebensdauer von <i>dPark9H</i> -Überexpressionsfliegen. ....	68
Abbildung 45: Erhöhte Sensitivität von <i>dPark9</i> -defizienten Fliegen auf Norspermidin. ....	69
Abbildung 46: Verringerung der Lebensspanne von <i>dPark9H</i> -Überexpressionsfliegen durch 40 mM Norspermidin in 10% Saccharose. ....	70
Abbildung 47: Minimaler Effekt von Zink auf die GFP-Intensität <i>dPark9</i> -defizienter dopaminergener Neuronen. ....	71
Abbildung 48: Keine Beeinflussung der GFP-Signalintensität der dopaminergen Neuronen von <i>dPark9H</i> -Überexpressionsfliegen durch Zinkchlorid. ....	72
Abbildung 49: Exposition gegenüber $MnCl_2$ reduziert die GFP-Signalintensität in dopaminergen Neuronen von <i>dPark9-knockdown</i> -Fliegen. ....	73
Abbildung 50: Reduzierte GFP-Intensität durch die Überexpression von <i>dPark9H</i> unter Zugabe von 7 mM $MnCl_2$ . ....	74
Abbildung 51: <i>DPark9</i> -defiziente dopaminerge Neuronen sind resistenter gegenüber Norspermidin. ....	75
Abbildung 52: Überexpression von <i>dPark9H</i> schützt dopaminerge Neuronen unter Norspermidin-bedingungen. ....	76
Abbildung 53: <i>Knockdown</i> von <i>dPark9</i> führt zur Akkumulation von $\alpha$ -Synuclein A30P. ....	77
Abbildung 54: Bestimmung der <i>knockdown</i> -Effizienz von <i>dPark9</i> -dsRNA in S2-Zellen mittels RT-PCR. ....	78
Abbildung 55: <i>Knockdown</i> von <i>dPark9</i> in S2-Zellen führt zur Akkumulation von synT. ....	78
Abbildung 56: Die Cathepsin D-Aktivität ist in jungen <i>dPark9-knockdown</i> -Fliegen erhöht. ....	79
Abbildung 57: Reduktion der Cathepsin D-Aktivität in jungen Überexpressionsfliegen. ....	80
Abbildung 58: DLM Entwicklung in <i>D. melanogaster</i> . ....	83
Abbildung 59: Abbauwege von $\alpha$ -Synuclein. ....	89



Abbildung 60: Beteiligung von ATP13A2 am Abbau von $\alpha$ -Synuclein. ....	91
Abbildung 61: Vergleich der beiden <i>UAS-dPark9 RNAi</i> – Linien 1 und 2. ....	118
Abbildung 62: Expressionsanalyse des Gens CG32000 in verschiedenen Entwicklungsstadien in <i>D. melanogaster</i> . ....	120
Abbildung 63: Expressionslevel von <i>dPark9</i> in verschiedenen Geweben. ....	121

## 7.2 Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Übersicht über die bekannten Parkinsonloki. ....	9
Tabelle 2: Übersicht über Mutationen und Symptome vom KRS. ....	11
Tabelle 3: Verwendeter Bakterienstamm und Zellkulturlinie. ....	22
Tabelle 4: Verwendete Responderlinien. ....	22
Tabelle 5: Verwendete Treiberlinien. ....	23
Tabelle 6: Verwendeter Wildtypstamm, Mutanten und weitere Stämme. ....	24
Tabelle 7: Verwendete Medien. ....	24
Tabelle 8: Verwendete Vektoren. ....	24
Tabelle 9: Verwendete Oligonukleotide. ....	25
Tabelle 10: Verwendete Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe. ....	26
Tabelle 11: Verwendete Kitsysteme. ....	26
Tabelle 12: Verwendete Puffer und Lösungen. ....	28
Tabelle 13: Verwendete Größenstandards und Enzyme. ....	28
Tabelle 14: Übersicht über die verwendete Software. ....	29
Tabelle 15: Letalität der <i>UAS-dPark9 RNAi</i> -Linien 1 und 2 mit verschiedenen Treibern. ....	43
Tabelle 16: Charakterisierung der Letalität in den <i>dPark9H</i> -Überexpressionslinien mit verschiedenen Treiberlinien. ....	44
Tabelle 17: Etablierte p[ <i>UAS-dPark9H-GFP</i> ]-Linien. ....	120

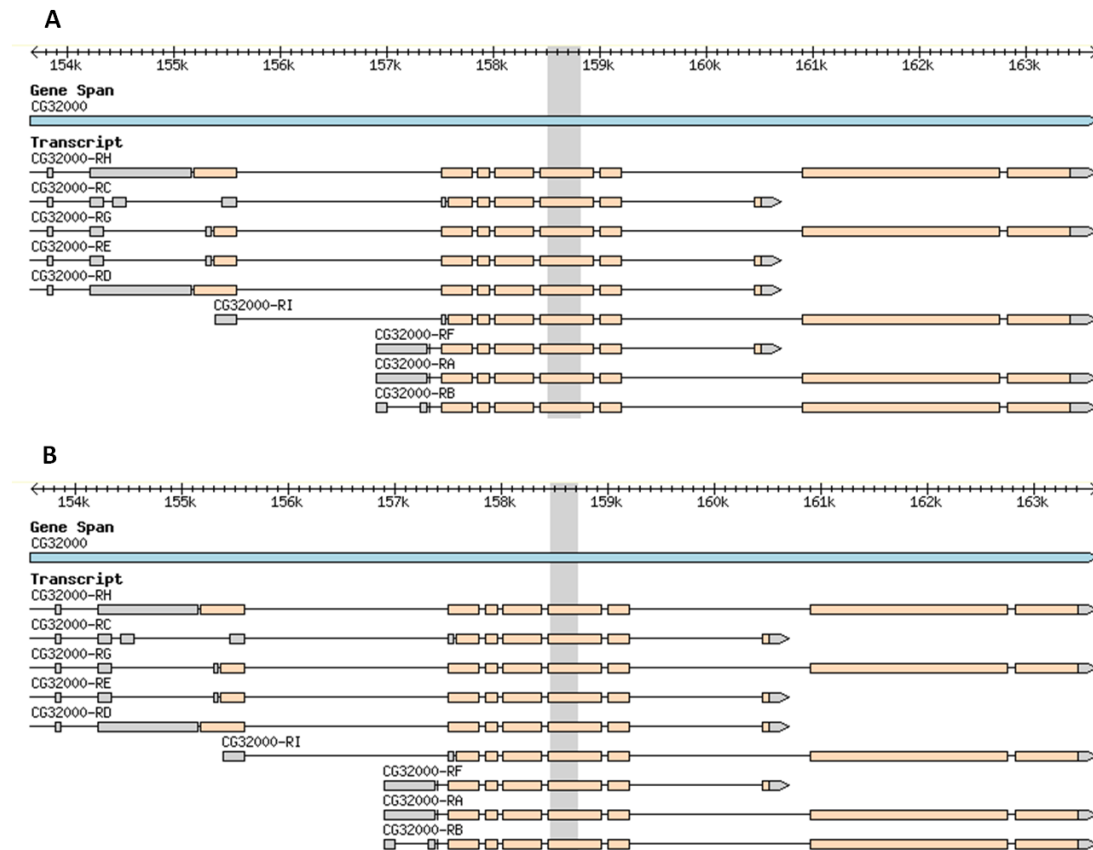
## 7.3 Verzeichnis der Abkürzungen

°C	Grad Celsius
$\mu$	mikro
A	Aktuator-domäne
aa	Aminosäure
A30P	Aminosäureaustausch an Stelle 30; Prolin für Alanin
A53T	Aminosäureaustausch an Stelle 53; Threonin für Alanin
AD	autosomal dominant
Amp	Ampicillin
APF	<i>after puparium formation</i>
AR	autosomal rezessiv
ATP	Adenosintriphosphat
B	Bradikinese
BSA	Bovines Serum Albumin
cDNA	<i>complementary DNA</i>

CDS	<i>coding DNA sequence</i>
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CS	Canton S
Cyo	<i>Curly of Oster, Blanancer (II)</i>
<i>D</i> <sup>3</sup>	<i>Dichaete, Marker (III)</i>
<i>da</i>	<i>daughterless</i>
DLM	dorsal longitudinale Muskeln
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy Nucleotid Triphosphat
DUB	deubiquitinierende Enzyme
E1	ubiquitinaktivierendes Enzym
E2	ubiquitinkonjugiertes Enzym
E3	Ubiquitinligase
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EB	Elutionspuffer
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EOPD	<i>early onset parkinsons disease</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-assoziiierter Proteindegradationsweg
<i>et al.</i>	und andere
Ex	Exon
GAL4	Transkriptionsfaktor aus <i>S. cerevisiae</i>
GFP	Green Fluorescent Protein
<i>GMR</i>	<i>glass multimer reporter</i>
GWAS	genomweite Assoziationsstudien
h	Stunde
HEK293T	<i>human embryonic kidney 293T</i>
<i>hONs</i>	<i>human olfactory neurosphere-derived</i>
HSP70	<i>heat shock protein 70</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
<i>Ki</i>	<i>Kinked, Marker (III)</i>
KRS	Kufor-Rakeb Syndrom
l	Liter
<i>lacZ</i>	Gen für $\beta$ -Galactosidase aus <i>E. coli</i>
I-LNv	Große ventrale laterale Neurone
LNv	Ventrale laterale Neurone
<i>LOM</i>	<i>larval oblique muscles</i>
LRRK2	Leucine Rich Repeat Kinase 2
M	Transmembrandomäne
MCS	<i>multiple cloning site</i>
<i>Mef2</i>	<i>myocyte enhance factor 2</i>
min	Minute
<i>MPP</i>	<i>mitochondrial-processing protease</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MTPT	1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin
<i>MVB</i>	<i>multivesicular body</i>
N	Nukleotidbindedomäne

NCLs	neuronale Ceroid-Lipofuszinosen
NGS	<i>normal goat serum</i>
NLF	<i>human neuroblastoma cells</i>
P	Phosphorylierungsdomäne
PAL	dorsolaterale anterielle protocerebrale Neurone
PAM	dorsomediale anterielle protocerebrale Neurone
<i>PARL</i>	<i>presenilin-associated rhomboid-like protease</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBT	PBS mit Triton-X
PCR	Polymerasekettenreaktion
PD	<i>Parkinsons disease</i>
Pdf	Pigment Dispersing Factor
PFA	Paraformaldehyd
PI	Haltungsinstabilität
PINK	PTEN-induzierte putative Proteinkinase
PPL1	dorsolaterale posteriore protocerebrale Neurone
PPM1/2	dorsomediale posteriore protocerebrale Neurone
R	Rigor
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
RNase	Ribonuklease
ROS	reaktive oxigene Spezies
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
s.	siehe
S2	Schneider Zellen
Sco	Scoutoid, Balancer des zweiten Chromosoms
sek	Sekunde
s-LNv	kleine ventrale laterale Neurone
<i>SNc</i>	<i>substantia nigra pars compacta</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
T	Tremor
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
Th	Tyrosinhydroxylase
<i>TM3</i>	<i>Third Multiple 3, Balancer (III)</i>
<i>TM6B</i>	<i>Third Multiple 6B, Balancer (III)</i>
TOR	<i>target of rapamycin</i>
UAS	<i>upstream activating sequence</i>
UPS	Ubiquitin-proteasomales System
<i>UTR</i>	<i>untranslated region</i>
VDRC	<i>Vienna Drosophila Research Center</i>
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

## 7.4 Graphen und Tabellen



**Abbildung 61: Vergleich der beiden *UAS-dPark9 RNAi* – Linien 1 und 2.** Der Bereich für die RNA-Interferenz für das Gen CG32000 ist grau hinterlegt. Der Interferenzbereich der RNAi – Linie 1 ist 290bp lang (A) wohingegen der gegen RNAi 2 nur 251bp beträgt (B). Durch die Interferenz sind alle neun Transkripte betroffen. ([www.flybase.org](http://www.flybase.org)).

### 7.4.1 Sequenz *dPark9H-GFP*

CTCGAGCAAAATGTTTCGCAAGTCAGAGCAAGGCTTGTGATTCTCCGAGTGAGACTGTGCACCTACAGTCTTTACC  
 AAATCATATTGAAGATCTAAAATTTAGAAATTCTGATGTTGAAACGGATGATGATCTTCACTTCCCTGGAATTGC  
 AGCTAAAAATAAAATCTTGAAGCTTAGCTGGTGGCATTCTCCTGTTGATATGCATTATGTAGCGACAGAATCAGT  
 GCAACCAAAAAAAGTGATAAAGTACCGAGCAATAAAATTAaaaaAGTTGAGAACAATAATACTTTAGTTAATGG  
 TTGTAGTAAAACTTCAGCAAGATCTGTTCCATTACTCAAATATAATCGTCCAGACCAGGATGGGGACAGCGAAGA  
 AAACATAACAAGCGTTCTTGAGCCAAACGTTGATGAAATCTATTCTAAAGACTCAGAACGGCTTGTGGATGATTC  
 AAAACCATGTATTGGACTATTAAATCCAGATCAGGAGGATCAAATGAAAGTATGCGGTTATCGACGTTCTCTTAT  
 GCGAATTGGTTTTTGTGGGCATGCATCTTCTTAAGTGGAGGCTGTTGCGCCTCGTGTTACATTGGTGGCGTCA  
 TTTTATTTTATATGCCACTTGCTCTCAATGTTTCATTGGAGGAGGCAGAACAGGTTTTGGTAACAGAGGATTATCA  
 AGGAAAGCACAAAATGTACCATGTAAAGCAAATCAAGTCCTAACGTCGAGCAACCTTAAGACACTTTTGAAAA  
 GGAACAGCAATCCATAGAAAGAACTCATATAGAATGCGATCATGTAGAAAACGTCCTTCAACTGTCAGTTCAATTT  
 TACCTCGGCCCAATTCAAAAAATGCTCATCAATACGAATTTTTTCGCTGCAAGCAATTGGTTTTATGCTTGGAAACA  
 TAATACAAATAGATTTCAAGGATAAATGGAAGTACGACCTAAATATTCCTTGTTTCATATTATCACCAACAGCGTGG  
 ATTACCTGTACATGAACAGATTTCAAGGCGAATTGTTTTCGGAGATAATGAGATAACTGTACCATTGCGAGATTT  
 CAAGACATTGCTGTTCTTAGAAGTACTTAATCCTTTTTACGTTTTTCAATTATTTTCTGTAATCTTTGGTTTAC  
 ATATGATTACTATTACTATGCTTGCCTAATACTCTTGATGTCAGTTTTTGGTATAACAGTGCTGTTTTACAAAC  
 GAAAAAGAATCAGGATGTGCTCCAAAAAACAGTATATAACACTGGTAATGCTTGGGTTGTTGATCATAAAGGACT  
 GTCTAAAGAGCTTCCAACGCGAGCGATAGTACCTGGGGACATCATTGAAATACCTCATCAGGTTGTACGCTGCA

TTGCGATGCAATCTTAATATCAGGAACTGCATTCTAGATGAGTCTATGCTTACTGGTGAAAGTGTGCCAGTGAC  
 CAAAACCTCCTCTACCGTCGAAACGTGACATGATTTTTGATAAAACAGAGCATGCCAGACATACACTTTTTTGTGG  
 CACAAAGGTTATTTCAGACTCGTTATATTGGCTCCAAAAAGTATTAGCATTTGTAATAAACACTGGAAACATAAC  
 GGCAAAAGGAGAACTTATACGTTCTATTCTTTATCCCCCCCCCTGTGGACTACAAGTTTGAACAAGATTTCGTACAA  
 ATTTATCCAGTTTCTGGCCATAATAGCATGTGTAGGATTTATTTATACGCTTGTAACATAAAATCTTGGCGTGGAAC  
 GGATCCTGTGAAAATAGCAGTTGAATCACTTGACCTTATCACAATTGTAGTCCCACCTGCACTTCCAGCGGCAAT  
 GACAGTCGGTCGATTTTATGCACAAAAGCGGCTAAAGACTAGTGAAATATTTTGCATATCTCCTAGGTCTATAAA  
 TGTGGCAGGAAGCATAAATTGTTGTTGCTTTGACAAGACTGGTACTCTTACGGAAGATGGACTTGACATGTGGGG  
 TGTGTTGCCCAAATCATCGACTAATCAATTTCAAATTTCCCTTAAAAAGTGTGATCGATTGCCATTTCGATCACTT  
 CCTTTTCGGTATGGTAACGTGTCATTCTATAACAATATTGAACGGCAGAATGATGGGCGACCCATTGGATTAAAA  
 AATGTTTCGAGTCTACAGGATGGGAAC TAGAAGATTCAAATAACATACCTGACACTGAAAAAATATGGTATTCTTTA  
 TCCAACAATTTTAAAGACAGCCAAGAGGTGGCCTTTCCGGTATGGCTGAAACCGAATCTGGATCTAAGAATGAAAT  
 TAAGCGGCAATCCTCAGTAGACGATTTACTAGCCACTGTTGGAATCTCGCCATCCCCAAAAGAATTTTGATCATGG  
 TATCGTTTCGAGAATTTCCATTTACTTCAGCTCTTCAGCGGATGTCTGTTGTTACTCGTTGTCTTAGTGACCAAGT  
 ATTTAATGTTTACTGCAAAGGTTCTCCCGAGATGTTGAAAAACTGTGTAAACCACAAAGTTTACCAGATAATTA  
 TTCGCAACAATATCGGAATTCGCAAAAAAAGGATACCGAATTATTGCCATTGCATTTAAAGCCCTTTCCACAA  
 GATGAATAACAAAAGTACAGCGTTTATCTCGCGAAGAGGTTGAAAACAACATGGAATTTTGGGTTTGTAT  
 ACTTGAGAATCGCCTTAAACCAGATACTACTAAAGTAATAAATGCGCTTAACGCAGCCAAAATTCGAATAAAT  
 GATAACAGGCGATAACATTTTAACTGCAATAAGCGTTGCTCGGGATTGTGGCATAAGTACCTCTCAATCAGT  
 TATAACAGTGCATGCAGATCCAATTGGTGACAGTGCAACATTCAAACATAACCGGTACAGAGTGTAAATTTTGA  
 TAACAGTTTCAGATAAACACTACAAGTTGCACTACACTTTAGATTTGGGTAGCAAGACATCTCGGGCATATCTGTT  
 TAAATCATGTTTTAACAGTAACCTTTTTGACCCTGAAACACCTGAATTCACGGCCCCAAGTTGGAAAAACTATTTT  
 TCATATGGAGTCGACGAATTCATTAGTTAACGAATCGACTTCTAGTTACGCAGAAAGTGGTTTGCCAAACAGCGA  
 TAGTTTGGCCAGTGTA AAAACTATAGACACTTGGACCCACAATGATGCTGAGCTTGGAATAAAACACACACCAGA  
 CGAAAGCTGGCGGCGGCAAGAATGCATATTTGCAATGGATGGTAAACTTGGCAAATGTAAAAGATTACTTTCC  
 AGAAGAATGGAATTCCTTTTGACACGGGGTTCTATTTACGCCCGAATGTACCCGATCAGAAACAGGCACACTAGT  
 TATAGAACTTCAAACCTTGGACTATTGCGTTGCCATGTGCGGTGATGGAGCCAATGACTGTGGTGCCTGAAGGT  
 GGCTCAGCTGGTATTTCCCTTAAGCGAGACTGAAGCATCTATAGCATCGCCATTTACTTCACGAAATCCCACAAT  
 TTCGGCGGTTTTTAAAGTTATTAAGGAAGGACGCGCTGCATTGGTCACATCGTTTGGTATTTTCAAGTATATGGC  
 AGCCTATTCGCTGGTTTCAGTTTATATCTGTTATGATTTTGTATTCCATCGACTCCAATTTGACGGACAAGCAGTA  
 TCTATATGTCGATCTTGGACTTATATCAATTTTGCCTTCTTTTTTGGTAAACTGAATCATTTGATGGAATGCT  
 GGTGGAACAAGTGCCGCTTAGTTTCATTAATATCCTCTACGCCATTAGCATCCCTTTTACTACATCTTACTGTTGT  
 AACAGCATTTTCAGGTGACTTGTGTTGGGTTTCATCTGCATCAACAGCCCTGGTTTAAAGCTTTCGAGCCTGCGGATGA  
 AGATCATTTAGGTTGCTTTGAAAACATAACAATGTTCTGCATATCTAGTTTCCAGTATATAATTCTAGCTTTTGT  
 TTTCTCAAAGGGAGCACCGTACAGAAAACCACTGTGGTTCGAATTGGCCACTGTGCTTAGCATTTATTGTAAATTT  
 GTGCATTATTGTATATTTGGTTCTTTACCCAGCGATTGGGTAGCATCCTTTTTTTCAGCTTATTGTACCTCCTAC  
 AATGAGATTTTCGATACGTTATGCTTGCATACGGAGCAGCATCATTTATATGTCATATTTTTGTGCGAGTCTTTCTT  
 GGTGTAATATCTAGTGTTCAAAAAATACCAAGTAAAGCGAGAGAAAAACTGGGTACATCGAAGCAAAAATACAT  
 GCGTCTAGAGCATGATATATCAAATATAAAAAACTGGCCACCTATAACTGAAGTTTATGAACCGAATAATTTAAT  
 AGACTGCGAAACTGAACAGCCACATATGTAAGTTTGCACGCTGAACAAAACCATGATACGCAGCTTGGAAAAGTT  
 TCCGGGATTTTGTGC **GGCCGCC** ATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATCTTGTGTAATT  
 AGATGGTGATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTCACTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAAACCTTAC  
 CCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACCTGTTCCATGGCCAACCTGGTCACCAACCTGACCTACGGCGT  
 GCAGTGCTTCTCCGTTACCCTGATCATATGAAGCGGCACGACTTCTTCAAGAGCGCCATGCCTGAGGGATACGT  
 GCAGGAGAGGACCATCTTCTTCAAGGACGACGGGAACCTACAAGACAGTGTCTGAAGTCAAGTTTGAGGGAGACAC  
 CCTCGTCAACAGGATCGAGCTTAAGGGAATCGATTTCAAGGAGGACGGAACATCCTCGGCCACAAGTTGGAATA  
 CAACTACAACCTCCACAAACGTATACATCATGGCCGACAGGCAAAAGAACGGCATCAAAGCCAACTTCAAGACCCG  
 CCACAACATCGAAGACGGCGGCGTGCAACTCGCTGATCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGT  
 CCTTTTACCAGACAACCATTACCTGTCCACACAATCTGCCCTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACAT  
 GGTCTTCTTGAGTTTGTAAACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAACATAACAAATA **TCTAGA**

in **gelb**: NotI-Schnittstelle; in **rot**: Kozak-Sequenz; in **grün**: KpnI-Schnittstelle; in **lila**: XbaI-Schnittstelle

### 7.4.2 Überexpressionslinie p[UAS-dPark9H-GFP]

p[UAS-dPark9H-GFP] Nr.	Insertions- chromosom	homozygot lebensfähig	x <i>actin-GAL4</i>
5.1	II	ja	<i>escaper</i>
11.1	III	ja	letal
16.1	II	ja	lebensfähig
16.2	II	ja	lebensfähig
17.2	III	nein	letal
17.4	II	ja	letal
20.1	II	ja	<i>escaper</i>
26.1	III	nein	letal

Tabelle 17: Etablierte p[UAS-dPark9H-GFP]-Linien.

### 7.4.3 Zeitliche und örtliche dPark9-Expression

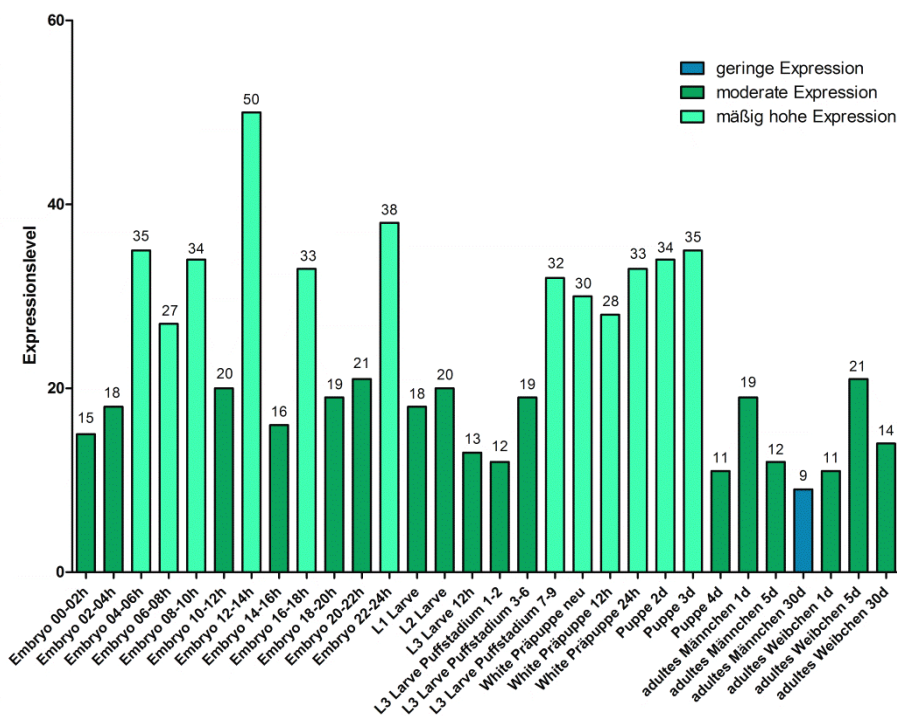
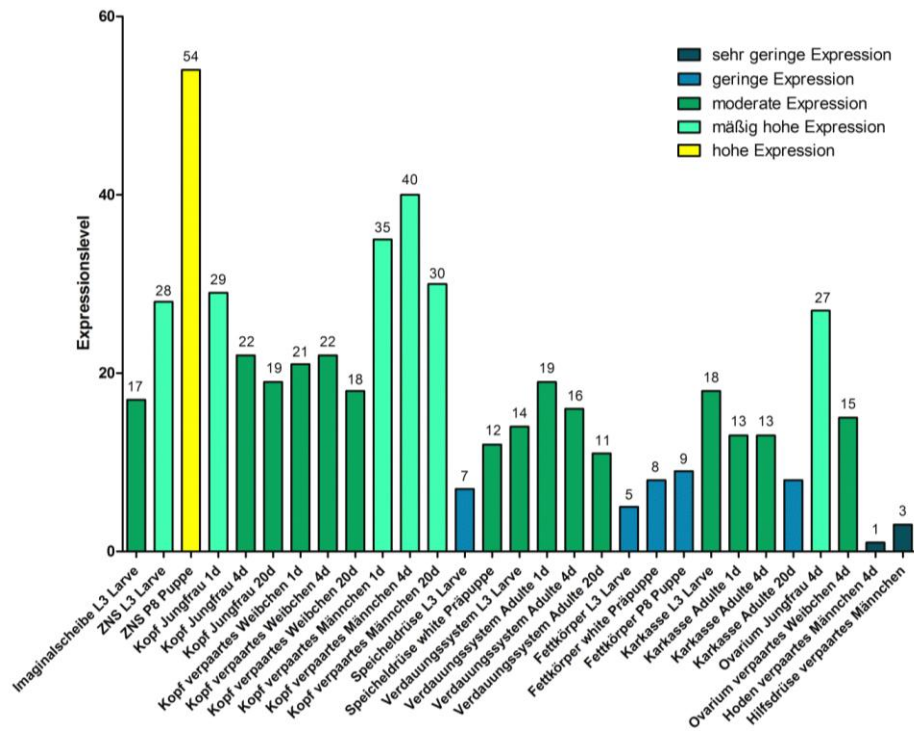


Abbildung 62: Expressionsanalyse des Gens CG32000 in verschiedenen Entwicklungsstadien in *D. melanogaster*. Das Gen wird während der gesamten Entwicklung durchgehend exprimiert. Das höchste Expressionsniveau ist während der Embryonalphase und im späten Larven- und frühen Puppenstadium zu finden (Graph nach [www.flybase.org](http://www.flybase.org)).



**Abbildung 63: Expressionslevel von *dPark9* in verschiedenen Geweben.** Die stärkste Expression findet im zentralen Nervensystem im Puppenstadium statt. Des Weiteren ist eine mäßig hohe Expression in männlichen Köpfen verschiedener Altersstufen zu beobachten (Graph nach [www.flybase.org](http://www.flybase.org)).



**Dank an...**

- ... Prof. Dr. Stephan Schneuwly für die Möglichkeit, diese Dissertation am Lehrstuhl für Entwicklungsbiologie anfertigen zu dürfen.
- ... José für die Betreuung der Doktorarbeit, neue Ideen und die Begeisterung für das Thema.
- ... Juan für die geduldige Beantwortung meiner Fragen, Versorgung mit Antikörpern sowie Bedienung von Geräten und Programmen.
- ... Eva und Susi für die Hilfe bei kleineren und größeren Problemen, Situationskomik, geteilte Zeit und offene Ohren.
- ... Agnes, Alois, Beibs, Conny, Heike, Margot, Mathias und Olli für die spontane Hilfe, Tipps und Lebensweisheiten.
- ... die TAs Anneliese, Gudrun, Renate und Uschi für die Hilfe bei Bestellungen, Keimbahntransformation, Paraffinschnitten sowie die Versorgung mit Süßigkeiten und die lustigen Mittagessen.
- ... Evi für die Hilfe bei allen verwaltungstechnischen Aufgaben, der Bedienung des Faxes und für die netten Gespräche.
- ... Prof. Dr. Frank Sprenger für die Vorschläge zur Arbeit und die Hilfe bei den Zellkulturversuchen.
- ... den Lehrstuhl Ziegler für die Benutzung des TECAN infinite M200 PRO.
- ... Frau Kühn für die Einführung und Hilfe am EM.
- ... meine Familie und Freunde für die durchgängige Unterstützung in allen Lebenslagen.